



**HAL**  
open science

# Impact d'une manipulation thermique embryonnaire chez le canard mulard

William Massimino

► **To cite this version:**

William Massimino. Impact d'une manipulation thermique embryonnaire chez le canard mulard. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2019. Français. NNT : 2019PAUU3050 . tel-02948553

**HAL Id: tel-02948553**

**<https://theses.hal.science/tel-02948553>**

Submitted on 24 Sep 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Ecole Doctorale Sciences Exactes et leurs Applications - ED211

Présentée et soutenue le 16 décembre 2019

par **William MASSIMINO**

pour obtenir le grade de docteur

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

**Spécialité : Physiologie & Biologie des organismes - Populations - Interactions**

Impact d'une manipulation thermique embryonnaire  
chez le canard mulard

## MEMBRES DU JURY

### RAPPORTEURS

- Xavier FERNANDEZ Directeur de Recherche, INRA INPT GenPhySE, HDR
- Sophie TESSERAUD Directrice de recherches, INRA Val de Loire, Unité de Recherche Avicole, HDR

### EXAMINATEURS

- Anne GABORY Chargé de recherches, INRA Jouy En Josas, Biologie du Développement et Reproduction (BDR)
- Claude DUCHAMP Professeur, Université Claude Bernard Lyon1

### DIRECTEURS

- Marianne HOUSSIER Maître de conférences, Université de Pau et des Pays de l'Adour
- Stéphane DAVAIL Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour



## Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse ont été réalisés au sein de l'UMR 1419 NuMÉA (Nutrition, Métabolisme, Aquaculture).

Je remercie Monsieur Xavier Fernandez Directeur de Recherches à l'INRA Occitanie-Toulouse et Madame Sophie Tesseraud, Directrice de Recherches à l'INRA Val de Loire qui me font l'honneur de participer à ce jury en tant que rapporteurs. Je remercie également Madame Anne Gabory et Monsieur Claude Duchamp en tant qu'examinateurs.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse Monsieur Stéphane Davail, Professeur des Universités et directeur adjoint du laboratoire NuMÉA pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour avoir dirigé cette thèse. Mais aussi pour sa bonne humeur et pour m'avoir laissé libre dans mes choix.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Marianne Houssier ma co-directrice de thèse, Maître de conférence à l'IUT de Mont de Marsan pour son attention de tout instant sur mes/nos travaux, pour ses conseils et son écoute qui ont été primordiaux au bon déroulement de la thèse. Son énergie et sa marche à vive allure ont été des éléments moteurs pour moi. Mais surtout sa franchise et sa sympathie, j'ai beaucoup appris à ses côtés. Je souhaite aussi remercier Monsieur Stéphane Panserat pour avoir été mon directeur spirituel avec beaucoup de conseils tout au long de ces travaux de thèses.

Merci à Karine Gontier, Karine Ricaud et Sandra Biasutti pour leur enthousiasme, leur sympathie et leur bonne humeur. Merci à Stéphanie Dollet pour sa gestion des autoclaves et le bon déroulement des commandes.

Je souhaite aussi remercier tous les partenaires qui ont permis le financement de ce travail à savoir le CD40 (Conseil Départemental des Landes), Mont de Marsan Agglo et le CIFOG (Comité interprofessionnel des palmipèdes à foie gras).

Je tiens à remercier Mme Sandrine Skiba, Directrice du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je remercie aussi Mme Anne Collin pour sa participation à mon comité de thèse ainsi que pour ses précieux conseils lors de la mise en place des expérimentations.

Merci à Mme Mireille Morisson pour toute son aide, sa bonne humeur et tout son temps consacré pour me préparer aux entretiens pour trouver une thèse lors de mon stage de Master 2 au sein du laboratoire GenPhySE.

Je remercie l'ensemble des personnels de l'UMR NuMÉA :

Merci à Anne Surget, Alexandre Herman pour sa rigueur et son aide pour les analyses plasmatiques, Vincent Veron, Laurence Larroquet, Marianne Cluzeaud, Elisabeth Plagnes-Juan.

Je souhaite également remercier tous les partenaires techniques, notamment l'UEPFG pour la réalisation des essais zootechniques et plus particulièrement Marie-Dominique Bernadet, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Jean-Marc Mallet et Joel Darbo.

Je remercie également tous mes acolytes de bureau, de repas et de soirées (raclettes) ... Merci à Timothé Duron, Tracy Pioche et Clara Pouget pour leur bonne humeur, merci à Jamal El Hachem, Samia et Hamed de m'avoir fait partager vos cultures (surtout les gâteaux libanais et tunisiens).

Et pour finir un très affectueux remerciement à ma famille, ma belle-famille et mes proches qui ont toujours cru en moi, mes parents pour leur soutien permanent, ma sœur et enfin, un immense merci à ma chérie pour avoir supporté mes changements d'humeur durant ces trois années et plus particulièrement pour les 6 derniers mois. Je remercie ma fille Octavia pour avoir apporté de la joie et m'avoir fait rire toute cette dernière année. Je vous aime énormément.

## SOMMAIRE

Remerciements .....	2
Liste des publications et communications .....	6
Liste des abréviations .....	7
Liste des figures .....	9
Liste des tableaux .....	9
Résumé .....	10
Abstract .....	11
Introduction .....	12
Etude bibliographique .....	17
1. Production et qualité du foie gras .....	18
1.1. Le canard mulard .....	18
1.2. Embryogenèse et élevage .....	18
1.3. Le gavage .....	22
1.4. Réglementation et critères de qualité du foie gras .....	25
2. Métabolisme hépatique des oiseaux .....	29
2.1. Métabolisme du glucose et des lipides lors de l'embryogenèse .....	30
2.2. Régulation hormonale des métabolismes glucidiques et lipidiques .....	32
2.3. Métabolisme du glucose chez l'adulte .....	37
2.3.1. Digestion, absorption et transport du glucose .....	37
2.3.2. L'utilisation et le stockage du glucose .....	38
2.3.2.1. Stockage et utilisation du glycogène .....	38
2.3.2.2. Catabolisme du glucose .....	42
2.4. Le métabolisme lipidique .....	45
2.4.1. Digestion, absorption et transport des lipides .....	45
2.4.2. Utilisation des lipides alimentaires .....	46
2.4.3. La lipogenèse <i>de novo</i> .....	48
2.4.4. La $\beta$ -oxydation des acides gras .....	50
2.4.5. Le transport des lipides .....	52
2.4.6. Le captage des lipides en périphérie .....	55
2.5. La stéatose hépatique .....	56
2.5.1. La stéatose chez l'homme .....	56
2.5.2. La stéatose hépatique chez l'oiseau .....	58
2.5.3. Réversibilité .....	58

<b>3. Régulation du métabolisme énergétique et réponses physiologiques au stress en lien avec le système endocrinien.....</b>	<b>59</b>
3.1. Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	59
3.2. Axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien .....	64
3.2.1. Production et sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	64
3.2.2. Rôle des hormones thyroïdiennes chez l'embryon .....	64
3.2.3. Rôle des hormones thyroïdiennes chez l'adulte.....	65
3.2.4. Rôle des hormones thyroïdiennes dans le métabolisme lipidique .....	67
3.2.5. Rôle des hormones thyroïdiennes dans la thermogenèse.....	67
<b>4. La programmation embryonnaire.....</b>	<b>73</b>
4.1. Découverte et principe de la programmation.....	73
4.2. Les mécanismes de la programmation .....	74
4.3. La programmation chez les oiseaux.....	75
4.3.1. Programmation nutritionnelle chez les oiseaux .....	75
4.3.2. Programmation lumineuse chez les oiseaux .....	76
4.3.3. Programmation thermique chez les oiseaux .....	78
4.3.3.1. Impact sur l'éclosabilité.....	79
4.3.3.2. Impact sur la thermorégulation .....	80
4.3.3.3. Impact sur la production de viande.....	85
4.3.4. Programmation thermique chez le canard .....	86
<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>88</b>
<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>91</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>109</b>
Article 1 (BMC Genomics, 2020): .....	111
Article 2 (Frontiers in Physiology, 2019):.....	148
Article 3:.....	169
<b>Discussion générale.....</b>	<b>185</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>203</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>207</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>236</b>

## Liste des publications et communications

### Publications dans des journaux à comité de lecture :

Article 1 : **William Massimino**, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Annabelle Tavernier, Karine Ricaud, Karine Gontier, Cécile Bonnefont, Hélène Manse, Mireille Morisson, Benoit Fauconneau, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier. *Positive impact of thermal manipulation during embryogenesis on fatty liver production in mule ducks* (Frontiers, 2019)

Article 2 : **William Massimino**, Stéphane Davail, Aurélie Sécula, 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)

Article 3 : **William Massimino**, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier. *Impact of embryonic thermal manipulation on the expression of genes involved in fatty liver production in mule ducks* (en preparation)

### Communications lors de congrès :

**William Massimino**, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Cécile Bonnefont, Hélène Manse, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier. *Impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in ducks. XVth EUROPEAN POULTRY CONFERENCE (2018), Dubrovnik, Croatia. (Oral communication)*

**William Massimino**, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Cécile Bonnefont, Hélène Manse, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier. *Impact d'une manipulation thermique pendant l'embryogenèse sur la production de foie gras des canards mulards. 13ème journées de la recherche avicole (2019), Tours, France. (Oral communication)*

**William Massimino**, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier. *Liver ontogeny in mule ducks: determination of the best embryonic thermal programming window. « Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry » and « Incubation and Fertility Research Group » combined workshop of WPSA 28-30 August 2019 TOURS, France. (Poster)*

## Liste des abréviations

ACAD : Acyl-CoA Dehydrogenase  
ACC : Acetyl CoA Carboxylase  
ACLY : ATP Citrate lyase  
ACSL : Acyl CoA Synthetase Long chain  
ADP : Adénosine Di-Phosphate  
AG : Acide gras  
AGL : Acide gras libre  
Akt : Akt / protein kinase B  
ApoA1 : Apolipoprotein A1  
ApoB : Apolipoprotein B  
ATP : Adénosine tri-Phosphate  
CIFOG : Comité interprofessionnel des palmipèdes à foie gras  
CEPT1 : Cholesteryl Ester Transfer Protein 1  
ChREBP : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein  
CPT1 : Carnitine Palmitoyl Transferase 1  
DGAT2 : DiacylGlycerol AcylTransferase 2  
DNL : *de novo* lipogenesis  
Elovl6 : Elongation of very long chain fatty acids protein 6  
ENO1 : Enolase 1 FA : Fatty Acid  
FABP : Fatty Acid Binding Protein  
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide  
FAS : Fatty Acid Synthase  
FAT/CD36 : Fatty Acid Transporter/Cluster of differentiation 36  
FFA : Free Fatty Acid  
GAPDH : Glyceraldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase  
GK : GlucoKinase

GLUT : Glucose Transporter 3

GPAT : Glycerol-3-Phosphate AcylTransferase

G6P : Glucose 6 Phosphate

HDL : High Density Lipoprotein

HK1 : HexoKinase 1

IGF1 : Insulin like Growth Factor

InsR : Insulin Receptor

LDH : Lactate DésHydrogénase

LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor

LMF1 : Lipase Maturation Factor 1

LPL : Lipoprotein Lipase

LXRA : Liver X Receptor Alpha

MT : Manipulation thermique

MTTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non Alcoholic Steato-Hepatitis

NEFA : Non Esterified Fatty Acid

PKA : Protein kinase A

PDH : Pyruvate DeHydrogenase

PPARA/G : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Gamma

ROS : Reactive Oxygen Species

SCD1 : Stearoyl CoA Desaturase

SGLT1 : Sodium Glucose Linked Transporter 1

SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein

TG : Triglyceride

UCP : uncoupling protein

VLDLR : Very Low Density Lipoprotein Receptor

## Liste des figures

<b>Figure 1: Représentation schématique d'un œuf avec ses principaux constituants</b> .....	20
<b>Figure 2: Anatomie simplifiée et embucquage d'un palmipède</b> .....	24
<b>Figure 3: Régulation de la glycémie</b> .....	35
<b>Figure 4: Régulation transcriptionnelle de la glycolyse et de la lipogenèse hépatique</b> .....	36
<b>Figure 5: Transport apical et basolatéral du glucose</b> .....	40
<b>Figure 6: Synthèse du glycogène dans le foie par la voie de la glycogénogenèse</b> .....	40
<b>Figure 7: Inactivation de la synthèse de glycogène</b> .....	43
<b>Figure 8: Glycolyse et Cycle de Krebs</b> .....	44
<b>Figure 9: la cétogenèse</b> .....	47
<b>Figure 10: Processus de la lipogenèse</b> .....	49
<b>Figure 11: Synthèse des acides gras polyinsaturés à chaîne longue</b> .....	49
<b>Figure 12: B-oxydation des acides gras</b> .....	51
<b>Figure 13: Synthèse des Triglycérides et de l'acyl-CoA et action des enzymes diacylglycerol acyltransferase (DGAT)</b> .....	53
<b>Figure 14: Composition des lipoprotéines</b> .....	54
<b>Figure 15: Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien</b> .....	63
<b>Figure 16: Régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes</b> .....	66
<b>Figure 17: Effets des hormones thyroïdiennes sur le métabolisme lipidique</b> .....	68
<b>Figure 18: Implication des hormones thyroïdiennes dans le métabolisme lipidique par l'action directe et indirecte de T3. La T3 stimule les TR = Thyroid receptor</b> .....	71
<b>Figure 19: Représentation schématique des diverses UCP au sein de la membrane interne des mitochondries chez les mammifères</b> .....	72
<b>Figure 20: Mise en place des mécanismes thermorégulateurs au cours de l'embryogenèse du poulet</b> .....	84
<b>Figure 21: Schéma de la répartition des traitements par loge</b> .....	103
<b>Figure 22: Courbe de gavage utilisée pour l'expérience DUCKPROG</b> .....	103

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1: Famille des transporteurs GLUTs et localisation chez les mammifères</b> .....	39
<b>Tableau 2: Séquences des amorces validées et utilisées dans les 3 articles</b> .....	96

## Résumé

Différentes études ont montré que des événements survenus très tôt dans la vie d'un animal pouvaient avoir des effets de « programmation » sur la physiologie de l'adulte. Récemment, il a été démontré que la manipulation thermique (MT) embryonnaire avait un impact sur le métabolisme hépatique chez les canards Pékin, 15 jours post-éclosion.

**Le premier objectif** de cette thèse était de décrire pour la première fois chez le canard mulard la mise en place du métabolisme hépatique pendant l'embryogenèse. Pour cela nous avons étudié l'expression de gènes d'intérêt dans le foie de canard mulard tout au long du développement. Nous avons mis en évidence un pic d'expression pour de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique autour du jour embryonnaire E20. Ces résultats n'ont pas été obtenus avant la mise en place du second objectif qui visait à mesurer l'impact d'une MT embryonnaire sur les performances des canards mulards. Pour mettre en place cette expérimentation nous nous sommes donc appuyés sur les précédentes études effectuées chez les poulets et le canard Pékin.

Pour **ce second objectif** nous avons testé trois modalités expérimentales d'augmentation de température sur des embryons de canards mulards. Nos résultats ont montré que toutes nos MT embryonnaires augmentaient significativement le poids de foie (jusqu'à +16,9% ;  $P < 0,0001$ ) après gavage, par rapport au groupe contrôle (sans MT), associé à une augmentation du contenu lipidique dans les trois groupes MT (+2,5 à 3%). Ces résultats démontrent donc la reproductibilité de cette technique, et ouvrent la voie à une nouvelle procédure simple et peu coûteuse pour la filière. Cependant, deux des groupes MT, présentant la même augmentation de température cumulée (+332°C) présentaient également une baisse d'éclosabilité et un taux de fonte lipidique à la cuisson plus élevé. Ceci laisse penser qu'une optimisation de la manipulation thermique embryonnaire pourrait être envisagée pour améliorer la qualité du foie gras, notamment en choisissant une MT modérée et discontinue.

**Dans une 3ème étude**, nous avons étudié l'effet des MT embryonnaires sur l'expression, mesurée après gavage chez les canards âgés de 95 jours, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique, le stress et les hormones thyroïdiennes. Après gavage, seules les expressions de quelques gènes semblent spécifiquement modulées par la MT embryonnaire. Ces résultats en cours d'analyse pourraient nous permettre d'identifier des cibles particulièrement sensibles aux MT appliquées pendant l'incubation, et jouant un rôle important dans le phénotype observé après gavage, caractérisé par un meilleur engraissement hépatique.

## Abstract

Various studies have shown that events that occurred very early in the life of an animal could have "programming" effects on the physiology of the adult. Recently, it has been shown that embryonic thermal manipulation (TM) has an impact on hepatic metabolism in Pekin ducks, 15 days post hatch.

**The first objective** of this thesis was to describe for the first time the metabolic ontogeny of the liver of mule ducks. To this end we have studied the expression of the genes of interest in the liver of mule duck throughout its development. We have highlighted peak expression for many genes involved in carbohydrate and lipid metabolism around embryonic day E20. These results were not obtained before the implementation of the second objective, which aimed to measure the impact of embryonic TM on the performance of Mulard ducks. To set up this experiment, we therefore relied on studies carried out on chickens and Pekin ducks.

**For this second objective**, we tested three experimental methods of increasing the temperature on mule duck embryos. Our results showed that all of our embryonic MTs significantly increased liver weight (up to + 16.9%;  $P < 0.0001$ ) after force-feeding, compared to the control group (without MT), associated with an increase in the lipid content (+ 2.5 to 3%). These results therefore demonstrate the great reproducibility of this technique, and open the way to a new simple and inexpensive procedure for the sector. However, two of the MT groups, exhibiting the same increase in cumulative temperature (+ 332 ° C) also had a lower hatchability and a higher lipid melting rate during cooking. This suggests that an optimization of embryonic thermal manipulation could be considered to improve the quality of foie gras, in particular by choosing a moderate and discontinuous TM.

**In a third study**, we studied the effect of embryonic TM on the expression, measured after overfeeding in 95-day-old ducks, of numerous genes involved in lipid and carbohydrate metabolism, stress and thyroid hormone pathways. These results under analysis could allow us to identify targets that are particularly sensitive to embryonic TM, and that could play an important role in the phenotype observed after overfeeding, characterized by better liver fattening.

## Introduction

Le foie gras est une spécialité culinaire française obtenue par le gavage de certains palmipèdes et valorisé grâce à de très bonnes qualités organoleptiques, il est inscrit au patrimoine culturel et gastronomique français (Loi n°2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole ajoutée à l'article L654-27-1 au code rural français). La production de foie gras est très développée en France avec plus de 16 398 tonnes produites en 2018 (Estimation CIFOG 2018), ce qui représente une augmentation de 41% par rapport à l'année 2017 (11 630 tonnes) impactée par les épizooties d'influenza aviaire survenues en 2015-2016 (H5N1) et lors de l'hiver 2016-2017 (H5N8). Même si sa production a diminué de 15% par rapport à 2015 (19 242 tonnes), la France reste le premier producteur mondial de foie gras dont elle représente presque 74%. Evaluée à 24 617 tonnes cette production mondiale est en forte hausse par rapport à 2017 (+34%). La France est suivie de la Hongrie (3 550 tonnes) et de la Bulgarie (2 800 tonnes). Le foie gras provient à 97% de canards, les 3% restant provenant des oies. La production de foie gras de canard est présente dans l'ensemble des régions de France, mais l'essentiel de la production est localisé dans les régions Nouvelle Aquitaine (54% de la production française en 2018), Occitanie (24%) et Pays de la Loire (18%). Le foie gras en France constitue une filière importante avec plus de 100 000 emplois directs et indirects. Les exportations de foie gras ont augmenté de +5% en volume sur l'année 2018 par rapport à l'année 2017. Le marché du Japon par exemple reste à reconquérir suite aux épizooties d'influenza aviaire avec une importation qui est passée d'un marché de 660 tonnes en 2015 à 170 tonnes en 2018.

Le bien-être des animaux est primordial, une mise aux normes a été faite en 2016 pour améliorer les conditions de claustration lors de la période de gavage des animaux en passant des cages individuelles (1000 cm<sup>2</sup> par animal) à des cages collectives (4 à 8 canards) pour plus de liberté de mouvement (de 1200 à 2000cm<sup>2</sup> par animal) et plus d'interaction avec les autres animaux. Les pressions sociétales se faisant de plus en plus fortes, les travaux scientifiques s'orientent vers la recherche d'alternatives au gavage et de réduction de la durée de la période de gavage. De plus, la filière est à la recherche de nouvelles stratégies de production dans un contexte économique avec des cours de matières premières qui n'ont cessé de fluctuer tout en augmentant ces dernières années (ITAVI, 2015). Tout ceci a poussé la filière à rechercher de nouvelles stratégies de

production pour répondre à leurs principales problématiques qui sont : améliorer le bien-être animal, améliorer la qualité des produits gras en réduisant notamment le taux de fonte à la cuisson, réduire la quantité de maïs utilisée ainsi que la durée du gavage. Pour répondre aux objectifs de la filière, de nombreuses études se sont inscrites dans la compréhension des mécanismes physiologiques et métaboliques mis en jeu chez les palmipèdes lors du gavage (Gabarrou et al., 1996; Davail et al., 2003; André et al., 2007; Gontier et al., 2013; Tavernier et al., 2017a). Grâce à l'avancée de ces connaissances, nous avons pu élaborer un travail d'un nouveau genre, avec pour objectif d'améliorer la production de foie gras tout en respectant le bien-être animal au moyen d'une nouvelle approche de manipulation thermique embryonnaire.

Le foie gras est un produit résultant d'une accumulation de lipides dans le foie, principalement des triglycérides (TG) due à une forte activité de lipogenèse (Saadoun and Leclercq, 1987; Hermier et al., 1999). En réponse à une alimentation riche en glucides lors du gavage, la lipogenèse *de novo* (synthèse de lipides à partir de glucides) est fortement stimulée chez les palmipèdes à foie gras. Un déséquilibre entre la synthèse et la sécrétion des lipides vers les tissus périphériques conduit à l'accumulation de ceux-ci dans le foie et au développement de la stéatose hépatique. Après 10 à 18 jours de gavage en fonction de l'espèce de palmipède gavé, le poids de foie peut être multiplié par 10 et le taux de lipides atteint plus de 50% du poids de foie, contre 5% environ dans le foie d'animaux maigres (Fournier et al., 1997; Hermier et al., 2003). Les triglycérides représentent la très grande majorité de ces lipides, environ 95%. Toutefois, si le gavage n'est pas prolongé, aucune lésion pathologique n'est induite (Bénard et al., 1998). Le poids de foie et la composition hépatique retrouvent des valeurs équivalentes à celles enregistrées avant gavage (Babilé et al., 1996, 1998; Bénard et al., 1998; Locsmándi et al., 2005).

L'embryogenèse étant extracorporelle chez les volailles il est facile de modifier les facteurs environnementaux. La température est considérée comme l'un des facteurs les plus influents sur le développement embryonnaire, l'éclosion et la croissance post-embryonnaire chez l'oiseau (DuRant et al., 2011; Yahav and Brake, 2014; Li et al., 2017b). Chez le poulet par exemple, il a été montré que les individus s'adaptent mieux au stress thermique pendant l'élevage si des manipulations de la température et de l'humidité sont appliquées au cours de la période précédant l'éclosion (Decuypere and Bruggeman, 2007; Renaudeau et al., 2012). En effet, les 50 dernières années ont vu des progrès significatifs

dans la sélection génétique des poulets de chair à croissance rapide (Havenstein et al., 2003a), mais ces améliorations ont été observées au détriment des capacités cardiovasculaire et respiratoire des oiseaux (Havenstein et al., 2003b), contribuant aux difficultés rencontrées par les animaux pour faire face aux stress thermiques, en particulier lorsque leur poids corporel est élevé (Renaudeau et al., 2012; Terim Kapakin et al., 2013). Ainsi **la manipulation thermique embryonnaire améliore la thermo tolérance du poulet** de chair en réduisant de 50% la mortalité à l'âge de 35 jours lors d'une exposition à la chaleur aigüe (Piestun et al., 2008b). Cette manipulation, également définie comme une « **programmation thermique** », fait partie du processus plus vaste de « programmation » basé sur les changements causés par diverses manipulations de l'environnement au cours d'une période critique, caractérisée par une grande plasticité des systèmes de commande physiologiques (Decuyper and Bruggeman, 2007; Willemsen et al., 2010).

Il a également été montré qu'une augmentation de température pendant le développement embryonnaire du poulet induit une augmentation du poids de filet (+39gr) à l'âge de 70 jours (Piestun et al., 2013), parallèlement à une diminution du taux de gras abdominal (Loyau et al., 2013). Même si les processus ne sont pas encore totalement élucidés, ces résultats indiquent que la programmation thermique embryonnaire peut avoir des effets physiologiques à long terme et induire des effets économiquement intéressants. Très peu de données relatives à l'effet des manipulations thermiques embryonnaires sont disponibles chez les canards. Seul le canard Pékin, essentiellement utilisé pour la production de viande en Chine, a été soumis à différentes conditions de températures d'incubation dans le but de modifier la masse musculaire. Malheureusement, ces études ont montré une inhibition du développement du pectoralis major (magret) pendant l'embryogenèse ainsi qu'à l'éclosion, après une augmentation de +1°C en fin d'incubation (Li et al., 2017b). Néanmoins, cette manipulation thermique entraînait une augmentation du poids du foie deux semaines après l'éclosion (Liu et al., 2015a) ainsi qu'une augmentation de l'activité et de l'expression de la FAS (fatty acid synthase) hépatique qui est une enzyme impliquée dans la lipogenèse (Wang et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la manipulation thermique embryonnaire chez les canards pourrait améliorer le stockage des lipides dans le foie, au moins à court terme.

Sur la base de ces résultats, notre objectif était donc de déterminer les effets d'une manipulation thermique embryonnaire chez le canard mulard, principalement utilisé pour la production de foie gras, afin de mesurer son impact sur le métabolisme hépatique et la stéatose hépatique induite par gavage.

Le premier objectif de cette thèse était de faire une **étude descriptive de l'ontogenèse hépatique** au cours de laquelle nous avons analysé l'expression de différents gènes impliqués dans le développement du foie, le métabolisme des lipides, du glucose ou du stress. Cette étude devait nous permettre de mettre en évidence des profils d'expression au cours de l'embryogenèse, et ainsi nous aider à cibler une période intéressante pendant laquelle appliquer une programmation thermique. Toutefois, la deuxième expérimentation a dû être mise en place avant l'obtention des résultats de l'étude descriptive, et consistait à **mesurer les effets de différentes manipulations thermiques embryonnaires sur la physiologie des canards mulards au cours des différentes phases d'élevage et de gavage**. Pour mettre en place cette expérimentation nous nous sommes donc appuyés sur différentes études faites chez le Poulet et le canard Pékin, et avons pu tester 3 conditions de MT embryonnaires. Dans un premier temps nous avons regardé l'impact de ces manipulations thermiques (MT) sur les caractéristiques zootechniques essentielles pour l'industrie du foie gras, de l'éclosion jusqu'en fin de gavage. Nous avons pu observer une éclosion plus précoce pour tous les groupes soumis à une MT. Des changements significatifs de la température et du poids corporel ont été mesurés à l'éclosion et tout au long de l'élevage. Enfin, les différentes MT embryonnaires augmentent de manière significative le poids de graisse abdominale (jusqu'à +13,3% ;  $P=0,0001$ ) et du foie (jusqu'à +16,9% ;  $P<0,0001$ ) corrélée à une augmentation du taux de lipides (jusqu'à +3%), par rapport au groupe contrôle (sans MT) gavé. Cependant, deux des groupes MT, présentent également une baisse d'éclosabilité et un taux de fonte lipidique à la cuisson plus élevé. Une optimisation de la fenêtre de manipulation thermique embryonnaire pourrait être envisagée pour améliorer la qualité du foie gras. C'est dans ce sens que l'étude d'ontogenèse pourra être exploitée, dans le but d'améliorer la technique en ciblant potentiellement des fenêtres d'expression de gènes d'intérêt.

Pour finir, une troisième étude nous a permis de **mesurer l'impact métabolique de nos MT** ayant conduit à l'augmentation de poids de foie, grâce à une analyse de l'expression de 88 gènes impliqués dans les mécanismes majeurs de production du foie gras, avant et après gavage.

Ce manuscrit se compose d'une étude bibliographique présentant l'état de la recherche concernant tous les aspects étudiés au cours de ce travail, et justifiant les expériences réalisées. Une partie « Matériels et Méthodes » viendra ensuite présenter les différents protocoles et techniques mis en œuvre lors des études réalisées. Ensuite les différents travaux menés seront présentés sous forme d'articles (1 publié, 1 soumis et un en cours d'écriture). Enfin, une dernière partie discutera des résultats obtenus avant de conclure et d'évoquer les perspectives de ce travail.

# Etude bibliographique

## 1. Production et qualité du foie gras

### 1.1. Le canard mulard

Le canard mulard est issu du croisement entre 2 genres de canards qui divergent phylogénétiquement de plusieurs millions d'année (Gonzalez et al., 2009) : un mâle de Barbarie (*Cairina Moschata*) du genre Cairinini et une femelle commune, généralement de race Pékin (*Anas Platyrhynchos*) du genre *Anas*. Par conséquent, le mulard est un hybride stérile qui nécessite le maintien des deux espèces parentales. Le croisement inverse, mâle Pékin et femelle Barbarie, permet d'obtenir un canard également stérile, appelé hinny. Ces canards sont également aptes à produire du foie gras, mais leurs performances sont plus proches de celles du canard de Barbarie avec une production inférieure à celle du mulard (Larzul et al., 2006). Les techniques d'insémination artificielle ont permis la démocratisation de l'élevage de canards mulards dans la production de foie gras. Il est aujourd'hui à l'origine de 90% de la production de foie gras en France (CIFOG 2018), et la carcasse est également valorisée grâce aux magrets et aux cuisses (confits). En France, seuls les mâles sont gavés car les femelles donnent des foies de moins bonne qualité (plus veinés, plus petits) (NB : ce critère est requis par le cahier des charges de l'IGP – indication géographique protégée), mais elles peuvent être utilisées pour leur chair. Le canard mulard est reconnu pour la qualité de ses foies gras, son aptitude au gavage et sa résistance aux maladies et aux conditions climatiques variées. Il présente une meilleure aptitude au gavage comparé à ses parents : il bénéficie d'un effet d'hétérosis, la complémentarité entre les effets génétiques favorables du mâle Barbarie et les effets maternels favorables de la cane Pékin, notamment pour des caractères tels que le poids de foie ou le gain de poids en gavage (Brun et al., 2005).

### 1.2. Embryogenèse et élevage

Le développement embryonnaire nécessite beaucoup de ressources. L'organisme en développement est fragile et a besoin d'importants apports pour se développer. Les nutriments, enzymes, ARN et anticorps, sont fournis par le gamète femelle, l'ovocyte, qui a gardé son cytoplasme et a accumulé des réserves (Chaffey, 2003). Chez les ovipares, l'embryogenèse se fait dans un espace clos : l'œuf. Les nutriments nécessaires au développement embryonnaire y sont présents et il n'y a presque pas d'échange avec l'extérieur, à part l'air et l'eau, pouvant filtrer au travers des pores de la coquille. Entouré

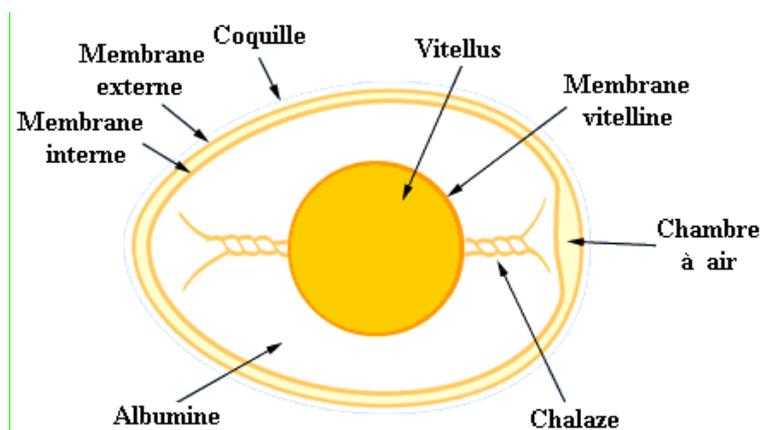
de sa coquille et se développant en dehors du corps de la femelle, l'embryon doit avoir à disposition l'ensemble des réserves de nutriments. L'œuf de poule domestique est notamment constitué d'une coquille (10 % du poids total de l'œuf) renfermant l'albumen (60 %) et le vitellus (30 %) (figure 1). La coquille est une membrane solide semi-perméable dont les nombreux pores laissent passer l'air et l'humidité. Elle est composée principalement de carbonate de calcium. Le calcium est donc un nutriment indispensable lors de la période de reproduction. La surface extérieure de la coquille est recouverte d'une fine couche, la cuticule, qui bloque l'entrée des bactéries et des poussières. Juste sous la coquille se trouvent les membranes coquillières externe puis interne. Elles sont formées de kératine, et empêchent l'entrée d'agents infectieux et délimitent la chambre à air. L'albumen, appelé couramment "blanc d'œuf", contient plus de 85 % d'eau, des sels minéraux, des vitamines et 11% de protéines avec plus de 40 protéines différentes (dont 50 % sont de l'ovalbumine) (Yadgary et al., 2010a; Shbailat and Abuassaf, 2018). C'est dans cette partie de l'œuf que se trouvent les lysozymes (Cucco et al., 2007), des enzymes protéiques antibactériennes (Prager and Jollès, 1996). La chalaze est un lien opaque qui lie le vitellus pour qu'il garde sa position centrale dans le blanc d'œuf. Ce vitellus, aussi nommé "jaune d'œuf", contient les réserves lipidiques, la majorité des vitamines et minéraux de l'œuf, ainsi que des hormones stéroïdes et environ 1% de glucose.

Depuis les années 1990 la production de canards mulards se fait par insémination artificielle car une différence de comportement entre un mâle Barbarie et une cane commune rend l'accouplement naturel rare. La cane Pékin est actuellement la race de canes commune la plus utilisée en France pour la production commerciale de mulards.

Le taux de fertilité représente le pourcentage d'œufs fécondés par rapport au nombre total d'œufs mis en incubateur. La fertilité est évaluée par un mirage des œufs, réalisé généralement à partir du 7ème jour d'incubation, et consistant à ausculter l'intérieur d'un œuf en le plaçant entre l'œil et une source de lumière intense. Cette méthode permet de distinguer des vaisseaux sanguins placés en forme d'étoile et donc de différencier les œufs non fécondés des œufs ayant donné lieu à un développement embryonnaire.

Chez les oiseaux, une caractéristique remarquable de la reproduction est la ponte continue d'œufs fertiles pendant plusieurs jours après une insémination naturelle ou artificielle. Sa base physiologique est le stockage des spermatozoïdes dans les glandes utéro-vaginales de la femelle. Les ovules sont ensuite fécondés progressivement par ces spermatozoïdes

(Brillard, 1993). Cela détermine une certaine « durée de la fertilité », définie comme le nombre de jours entre l'insémination et le dernier œuf fécondé (Lake, 1975). Sa valeur moyenne est caractéristique de chaque espèce. Dans le cas d'un croisement inter génétique comme celui du canard mulard, cette durée est faible, ce qui oblige, hormis les possibilités offertes par la sélection, à inséminer les femelles deux fois par semaine pour maintenir un taux de fertilité convenable de l'ordre de 70% (Brun et al., 2005).



**Figure 1: Représentation schématique d'un œuf avec ses principaux constituants**

En moyenne, il faut 32 jours d'incubation aux œufs de canards mulards pour arriver à l'éclosion, ce qui se situe à la moyenne des durées d'incubation des espèces parentales, qui sont de 28 jours chez le canard commun et 35 jours chez le Barbarie. Les embryons hinny nécessitent 34 jours d'incubation et 21 jours chez les poulets. Ramirez et al., (1976) ont rapporté que le déséquilibre du sex-ratio à la naissance, en faveur des mâles mulards, est vérifié en permanence par les accoueurs qui pratiquent le sexage à l'éclosion avec environ 55% de canetons mâles. Le croisement réciproque affiche un déséquilibre similaire toujours en faveur des mâles (Batellier et al., 2004). Ce déséquilibre est conforme à la règle de Haldane (Haldane, 1922) qui postule que le déficit de viabilité ou de fertilité d'un hybride interspécifique concerne le sexe hétérogamétique, en l'occurrence ici la femelle. L'éclosabilité est le pourcentage d'œufs fertiles qui amène à l'éclosion d'un caneton vivant. Le pourcentage de mortalité embryonnaire est représenté par la différence entre le nombre d'œufs fertiles et le nombre de canetons vivants après éclosion. L'éclosabilité des œufs mulards est généralement comprise entre 70 à 80% des œufs fertiles (Marie-Etancelin et al., 2008; Liu et al., 2015a). Il y a peu d'estimations comparatives du taux d'éclosabilité entre embryons mulards et embryons de souche pure issus de la même population de

cannes. Des valeurs similaires sont obtenues concernant le pourcentage d'embryons vivants au 12<sup>ème</sup> jour d'incubation par Brun and Larzul (2003) (71,6% en croisement et 70,6% en pur). Les causes de mortalité diffèrent selon le stade (Sauveur, 1988). On distingue 3 périodes de mortalités : la mortalité précoce qui intervient entre la fécondation et le 1<sup>er</sup> mirage (7<sup>ème</sup> jour d'incubation), la mortalité intermédiaire, entre le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation et le 2<sup>ème</sup> mirage juste avant la mise en éclosoir, et la mortalité à l'éclosoir, qualifiée de tardive. Brun et al (2004) trouvent une mortalité précoce apparente (estimée par mirage) de l'ordre de 2,5% des oeufs fécondés sans différence entre les embryons mulards et les embryons de souche pure. Une différence faible mais significative de mortalité intermédiaire est observée (6,3% des embryons vivants au 1<sup>er</sup> mirage en mulards vs 3,9% en pur), mais aucune différence de mortalité à l'éclosoir. Si aucune différence de mortalité embryonnaire précoce entre embryons mulards et embryons 'communs' n'est observée, l'autopsie des oeufs qui semblaient clairs au 6<sup>ème</sup> jour d'incubation indique, en revanche, une différence de mortalité embryonnaire très précoce, survenant avant-même l'oviposition, estimée à 11,1% des oeufs fécondés pour les mulards et à 5,6% pour les purs (Sellier et al., 2005). Au total, la mortalité précoce s'élève à 14,9% des oeufs fécondés en croisement et à 10,3% en pur (Brun et al., 2004). Selon Tchelycheva et al (1993), cette augmentation de mortalité rapide chez les embryons hybrides pourrait en partie s'expliquer par un blocage de la condensation de certaines régions chromosomiques lors des mitoses.

Au cours des premières semaines après l'éclosion, les canetons ont une croissance très rapide (Marie-Etancelin et al., 2008) par rapport à d'autres espèces aviaires domestiques. Cette croissance rapide des canards communs permet un développement précoce des tissus gras et des plumes, compatible avec le mode de vie aquatique des canards colvert, ancêtre des souches domestiques de canards communs (Knížetová et al., 1995). En revanche les canards de Barbarie ont une croissance moins précoce, ils ont besoin de plus de temps pour arriver à leur poids final. Différentes études ont été faites sur la croissance des canards mulards jusqu'à l'âge d'abattage, comparée ou non avec celle des espèces parentales. Olver et al (1977) ont montré que jusqu'à l'âge de 10 semaines post-éclosion, les canards communs et mulards étaient significativement plus lourds que les Barbarie et les hinnies. A partir de 10 semaines, ce sont les mâles communs qui sont les plus légers et les mâles Barbarie qui sont les plus lourds, les deux croisés étant complètement intermédiaires.

Les différences de croissance entre les espèces parentales et les deux croisés s'expliquent par des effets génétiques additifs directs, maternels et d'hétérosis (Dickerson, 1969). Chez le canard mâle, les différences de croissance entre les espèces parentales s'expliquent essentiellement par les effets additifs directs, les effets maternels étant significatifs uniquement en début de croissance, jusqu'à 4 ou 6 semaines d'âge (Tai and Rouvier, 1998).

Les palmipèdes élevés pour la production de foies gras sont soumis à plusieurs phases de transitions alimentaires lors de l'élevage, avec des changements de compositions d'aliment ainsi que des changements de rythme de prise alimentaire. Ces changements ont pour objectifs d'adapter l'alimentation à l'évolution des besoins des animaux et de les préparer à la phase de gavage. En fin d'élevage lors de la phase de préparation au gavage les animaux reçoivent un repas par jour (vs une alimentation à volonté avant) ensuite les palmipèdes, âgés de 12 semaines en moyenne pour les canards, sont placés en gavage.

### 1.3. Le gavage

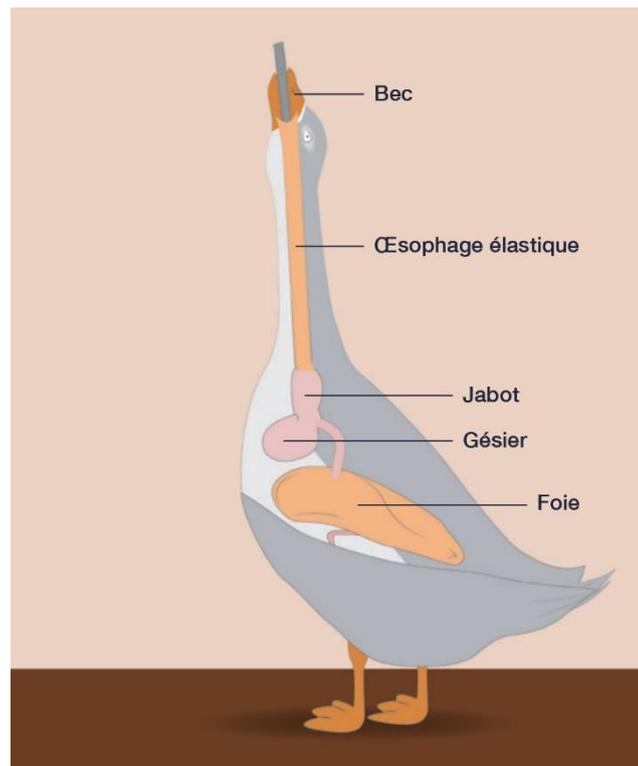
Chez les palmipèdes migrateurs, la stéatose est un moyen naturel et réversible (Babilé et al., 1996, 1998; Bénard et al., 1998; Locsmándi et al., 2005) de constituer les réserves d'énergie en vue des grandes migrations (Odum, 1960). La découverte de cette faculté des palmipèdes à faire du foie gras remonte à l'Égypte antique. En effet, en vue de préparer leur migration, les oies sauvages augmentaient leurs *ingesta* entraînant un engraissement hépatique important.

Cette capacité de stockage est exploitée depuis 2500 avant J.C., lorsque les égyptiens engraisaient les oies pour nourrir la population. La pratique a été ramenée en France par les Romains ("Le Foie Gras - Magazine officiel du Foie Gras," n.d.).

Cependant, tous les palmipèdes ne sont pas aptes à produire du foie gras. Des comparaisons de cette capacité ont été faites entre le canard de Barbarie, le canard Pékin et le canard mulard (Baéza et al., 2005). Ainsi, lors du gavage, pour une même quantité d'aliment consommée, les canards de Barbarie et les mulards développent un foie plus lourd que le canard Pékin. Les mulards développent également un foie plus lourd que les canards de Barbarie lorsque ceux-ci sont nourris selon leurs capacités maximales d'ingestion. En revanche, le canard Pékin présente un engraissement périphérique plus prononcé que les canards mulards et de Barbarie, le canard mulard ayant un engraissement intermédiaire. Ces performances zootechniques sont le résultat d'une

meilleure capacité des canards de Barbarie et mulards à synthétiser et stocker les lipides dans le foie (Saez et al., 2009). De plus il a été montré chez le canard mulard que sa capacité d'accumulation des lipides dans le foie serait également le résultat d'un fort recaptage des lipides au niveau hépatique, associé à une forte lipogenèse, tandis que les canards Pékin ont une meilleure capacité à exporter les lipides (Saez et al., 2012; Tavernier et al., 2017a).

En moins de 30 ans, entre 1987 et 2013, la durée de la période de gavage des canards mulards est passée de 15,6 jours à 10 jours, grâce à la sélection des animaux les plus adaptés (Indice de consommation, poids du magret et du foie, poids prêt à engraisser) et aux progrès techniques réalisés (Source : ITAVI). Elle atteint à présent 11 jours en moyenne au rythme de 2 repas par jour à partir de l'âge de 12 semaines environ (81 jours pour les canards mulards et 82 jours pour les canards de Barbarie). Les repas sont quasi exclusivement composés de glucides sous la forme de maïs (grain entier et farine) et sont au minimum au nombre de 20, pendant 10 jours minimum ("IGP Canard à foie gras du Sud Ouest," n.d.). Les repas pèsent aux environs de 400g en début de gavage et augmentent progressivement jusqu'à 700-800g à la fin du gavage. Cette augmentation progressive des repas est faite selon la capacité de digestion de l'animal, et va activer la lipogenèse et conduire à la stéatose hépatique, pouvant multiplier par 10 la taille du foie sur la période de gavage (Hermier et al., 1994). Il faut environ 10kg de maïs pour produire un foie gras de 550g. Le geste principal du gavage consiste à déposer dans le jabot (figure 2) de l'animal le mélange de maïs et d'eau à l'aide d'un embuc qui est un tube lisse adapté à l'anatomie de l'animal (i.e. diamètre et longueur de l'œsophage). « L'embucquage » ne dure en moyenne qu'une dizaine de secondes par animal, avec le matériel couramment utilisé.



**Figure 2: Anatomie simplifiée et embucquage d'un palmipède**

Le gavage fait l'objet de plus en plus d'encadrement légal à cause d'une pratique sujette à de nombreuses controverses. Les recherches vont donc dans le sens d'améliorer le bien-être des animaux et de limiter la durée, le nombre des repas et/ou leur quantité. Toutefois, les expérimentations conduites sur la question du bien-être des animaux montrent que le gavage n'induit pas d'état de stress chez le canard mulard. Le taux plasmatique de corticostérone (hormone du stress) n'augmente pas durant la période de gavage du canard (Guémené et al., 2001). Le gavage ne perturbe pas plus les palmipèdes que le fait de les attraper ou de les emmener s'abriter, manœuvres courantes dans tous les élevages (Faure et al., 2001). Aucune des études réalisées ne permet de conclure qu'il existe des réponses douloureuses directement imputables au gavage. Les études neurophysiologiques montrent que, durant toute la période de gavage, les signaux nerveux nociceptifs sont occasionnels et leur amplitude très limitée (Servièrre et al., 2011).

Le gavage augmente la thermogénèse alimentaire en stimulant la digestion ce qui amène une augmentation de la température corporelle. Les canards n'ont pas de glandes sudoripares, et leur plumage est isolant, ce qui limite leur capacité à faire face à un excès de chaleur corporelle (après le gavage ou en été, par exemple). Pour abaisser la température de leur corps, ils doivent ouvrir le bec et haleter pour abaisser la température de leur organisme (polypnée thermique). Ce halètement est souvent interprété par les visiteurs comme une « souffrance » alors qu'il s'agit, d'un réflexe thermorégulateur (Richards, 1970).

#### **1.4. Réglementation et critères de qualité du foie gras**

L'appellation des produits issus du foie gras est réglementée par la législation française (Décret n°93-999 du 9 août 1993, relatif aux préparations à base de foie gras). Ainsi, seuls 3 produits bénéficient de l'appellation "foie gras" :

- Le foie gras entier de canard ou d'oie est un produit composé d'un foie gras entier ou d'un ou plusieurs lobes de foie gras ainsi que d'un assaisonnement. C'est le type de foie gras ayant la plus forte valeur économique.
- Le foie gras de canard ou d'oie est un produit composé de morceaux de lobes de foie gras agglomérés ainsi que d'un assaisonnement.
- Le bloc de foie gras de canard ou d'oie est un produit composé de foie gras reconstitué ainsi que d'un assaisonnement. La quantité d'eau ajoutée ne doit pas dépasser 20% de la masse de la préparation.

Le foie gras peut aussi être vendu cru, sous cette forme il ne se garde pas longtemps. Le foie gras est donc souvent commercialisé cuit ou mi-cuit afin d'allonger sa durée de vie. Le **mi-cuit** est pasteurisé entre 70°C et 100°C et se conserve plusieurs mois au réfrigérateur en conservant tous les arômes d'un produit frais. Le foie gras **cuit** est stérilisé en autoclave à plus de 105°C et peut être ainsi conservé pendant plusieurs années dans un milieu frais et sec.

Des labels de qualité tels que l'Indication Géographique Protégée (IGP) ou le Label Rouge (LR) peuvent imposer des cahiers des charges plus précis notamment concernant l'espèce du canard élevé mais aussi concernant les pratiques d'élevage et de gavage. Par exemple, les foies gras bénéficiant de l'appellation IGP doivent nécessairement être issus de canards mâles, mulards ou Barbarie.

Le foie gras est principalement composé de lipides (autour de 55%) qui donnent au produit ses qualités organoleptiques. Il est donc important que le foie conserve ses lipides lors de la cuisson et cette capacité est le principal critère de qualité des foies gras. La perte lipidique lors de la cuisson, appelée aussi fonte, est estimée par le rapport entre l'exsudat et le poids de foie frais (en pourcentage). Ce taux de fonte est un critère très variable et est réglementé par la législation française (Décret n°93-999 du 9 août 1993) : il ne doit pas dépasser 30%. On parle aussi de rendement technologique, il se déduit du taux de fonte par la formule suivante :  $100 - \text{taux de fonte}$ , il est aussi exprimé en pourcentage. La fonte à la cuisson est donc une problématique essentielle pour les acteurs de la filière, la variabilité de ce critère ayant pour conséquence une hétérogénéité des produits finis, qui porte sur le poids net de foie consommable, la présentation du produit et une diminution des qualités organoleptiques. De plus selon la législation les foies doivent avoir un poids net d'au moins 300gr pour les canards et 400g pour les oies. Il existe plusieurs qualités sensorielles essentielles au foie gras, il doit avoir une couleur claire et uniforme sans lésions ou trace de sang visible. Un foie gras de canard a un ton jaunâtre alors qu'un foie gras d'oie présente un ton rose clair (Robin et al., 2004). La texture est aussi une qualité sensorielle importante, le foie gras doit être ferme, lisse avec une texture régulière et fine (Cazeils et al., 1999). Le critère de qualité le plus important est le goût, le foie gras de canard a un goût prononcé tandis que celui de l'oie est léger et délicat (Rousset-Akrim et al., 1994).

Aujourd'hui le poids de foie est la seule clé de tri objective disponible pour les transformateurs permettant de limiter la variabilité de la fonte à la cuisson. Dans l'industrie un tri sur des paramètres de texture appréciés manuellement par des personnes qualifiées et entraînées est également effectué. Il permet de caractériser l'onctuosité, le grain, la consistance et la finesse. Cependant cela reste très subjectif car ce tri est dépendant de l'opérateur. La variabilité de la fonte reste élevée. Des facteurs de variation ont été identifiés qui sont des paramètres liés à l'élevage (mise en gavage trop tôt), au gavage et à l'abattage (Auvergne, 1992; Setiawan, 1994). Une mise en gavage anticipé (à 11 vs 13 semaines d'âge) pourrait provoquer une compétition entre la fin de la croissance musculaire et le développement de la stéatose hépatique chez les animaux. La masse musculaire du *pectoralis* des canards se développe tardivement, entre 10 et 12 semaines, et le développement se poursuit jusqu'à 15 semaines (Auvergne, 1992). L'alimentation riche en glucides et pauvre en protéines au cours du gavage amène une compétition entre les besoins protéiques des muscles pectoraux et les besoins du foie en réponse à la lipogenèse (Babilé et al., 1993, 1994). Celle-ci est encore plus importante en début de gavage quand l'ingéré en maïs est insuffisant pour couvrir les besoins protéiques des animaux. Le rapport lipides/protéines étant plus faible il pourrait participer à une augmentation du taux de fonte à la cuisson des foies gras de canard (Baudonnet, 1993; Setiawan, 1994). D'autres paramètres impactant la fonte peuvent être liées au gavage, une ingestion importante dès le début du gavage du canard de Barbarie (Babilé, 1989) et du canard mulard (Baudonnet, 1993) permet un gain de poids de foie supérieur en fin de gavage et permet d'améliorer le taux de fonte à la cuisson. Inversement, une diminution de l'ingestion de maïs en fin de gavage augmente le taux de fonte des foies gras de canard mulard, qui s'explique en partie par une différence de poids de foie (Latil et al., 1996). De plus, la courbe de gavage a une influence forte sur les performances de poids de foie et sur ses qualités. Cette courbe correspond aux quantités de maïs distribués à chaque repas au cours du gavage. Elle est caractérisée par la quantité ingérée au premier repas, une pente en début de gavage qui traduit l'augmentation de la quantité ingérée de maïs entre deux repas consécutifs, un palier final qui correspond à la quantité maximale ingérée. Les conditions autour de l'abattage des animaux ont aussi un impact important sur la qualité technologique des foies gras. Par exemple, lors d'une éviscération « à chaud », le foie est retiré de la carcasse immédiatement en fin de chaîne d'abattage. En revanche, si la

carcasse est placée en réfrigération avant le retrait du foie, on parle d'éviscération « à froid ». La pratique de l'éviscération à froid est connue pour détériorer le rendement technologique et favorise donc la fonte lipidique à la cuisson du foie gras d'oie (Babilé and Auvergne, 1986; Rousselot-Pailley et al., 1992) et de canard mulard (Castaing and Robin, 1990). Dans ce cas, l'hypothèse des auteurs pour expliquer cette détérioration du rendement technologique porte sur le refroidissement plus lent du foie à l'intérieur de la carcasse. Ce délai de refroidissement impliquerait une activité importante des enzymes des catabolismes protéique, lipidique et glucidique post mortem. La teneur en acides gras libres est elle aussi plus importante lors d'une éviscération à froid (Bouillier-oudot et al., 2002). Les activités glycolytiques sont aussi concernées avec une diminution des réserves en glycogène au cours de la réfrigération (Bouillier-oudot et al., 2004). Néanmoins, les mécanismes reliant la teneur en glycogène à la fonte lipidique à la cuisson ne sont pas identifiés à notre connaissance. Des études ont aussi permis de mettre en évidence un lien entre la fonte lipidique et de nombreux paramètres tels que le type et les caractéristiques génétiques de l'animal, le poids de foie et sa composition biochimique (taux de lipides, rapport protéines/lipides). De la même façon, chez l'oie, un allongement de la durée de gavage (14, 18 et 21 jours) pénalise le rendement à la cuisson (Bouillier-oudot et al., 2002), mais conduit également à des poids de foies plus importants. De même, (Robin et al., 2002) ont montré qu'une réduction de la durée de gavage conduisait à une diminution de la fonte liée à une diminution du taux de lipides dans les foies gras. Pour des poids de foie équivalents, une diminution de la fonte à la cuisson est associée à une teneur inférieure de l'enzyme Lactate DésHydrogénase (LDH) sérique chez des animaux gavés pendant 14 jours par rapport à ceux gavés 20 jours (Babilé, 1989). L'augmentation de la teneur en LDH sérique chez les animaux gavés sur une plus longue période est le signe de lésions des membranes cellulaires et d'un accroissement de leur perméabilité (Auvergne, 1992). Une corrélation importante est trouvée entre le rendement technologique et le rapport protéines sur lipides chez le canard de Barbarie ( $r = 0,78$  à  $55^{\circ}\text{C}$  et  $r = 0,83$  à  $105^{\circ}\text{C}$ ) ainsi que chez le canard mulard ( $r = 0,91$  à  $55^{\circ}\text{C}$  et  $r = 0,93$  à  $105^{\circ}\text{C}$ ) (Baudonnet, 1993). Chez l'oie, le taux de fonte est également corrélé négativement avec les protéines ( $r = - 0,62$  ;  $- 0,71$  ;  $- 0,74$  ; pour (Nir et al., 1973; Blum et al., 1990; Bouillier-oudot et al., 2008) respectivement). Chez le canard, une relation similaire entre taux de fonte et taux de protéines a été mise en évidence bien que plus faible ( $r = - 0,54$  ;

(Theron et al., 2012)). Le rapport protéines sur lipides est relié à la qualité technologique des foies gras d'oie (Blum et al., 1990). Il traduirait la capacité des structures non lipidiques à maintenir les inclusions lipidiques et ainsi à réduire la fonte à la cuisson. Des études ont montré que l'addition de protéines dans l'alimentation des animaux en gavage améliore le gain de poids du foie ainsi que le rendement technologique chez l'oie (Blum et al., 1971; Nir et al., 1973; Nitsan et al., 1973). L'addition de protéines compenserait le déficit en protéines dû à l'utilisation exclusive du maïs (en particulier au début du gavage) et permettrait, selon (Nir and Nitsan, 1976), d'assurer une bonne intégrité des membranes des hépatocytes qui résisteraient alors mieux aux traitements thermiques. Des études portant sur l'héritabilité de la qualité technologique ainsi que sur la recherche de zones chromosomiques à effet quantitatif ('QTL' pour 'Quantitative Trait Locus') associées à ces paramètres, ont été menées chez le canard mulard. Le taux de fonte présente une héritabilité moyenne sur la voie maternelle (0,17) et faible sur la voie paternelle (0,09) (Marie-Etancelin et al., 2008, 2011).

## **2. Métabolisme hépatique des oiseaux**

Semblable à celui des mammifères, le foie des oiseaux est impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques. Il joue un rôle important dans la digestion et régule la production, le stockage et la libération des lipides, des glucides et des protéines (Denbow, 2000). La principale matière première carbonée utilisée dans l'alimentation des palmipèdes est le maïs dont la composition chimique est très riche en glucides (75,4% d'amidon vs. 3,7% de matières grasses brutes) ((Sauvant et al., 2004); franceagrimer 2016).

Pourtant, malgré le faible taux de matière grasse apporté par l'alimentation, les lipides représentent la forme majeure de réserve énergétique chez les oiseaux, nécessitant donc la transformation des glucides majoritaires en lipides, via la voie métabolique de la lipogenèse *de novo*. Comme chez l'Homme et les rongeurs (Hanson and Ballard, 1967; Mourot and Kouba, 1999; Bergen and Mersmann, 2005), le foie est le principal site de la lipogenèse, entraînant donc chez les oiseaux un rapide engraissement lors d'une surcharge alimentaire, (Leveille et al., 1975b). Le foie produit également diverses protéines, notamment des protéines sanguines, des enzymes, des hormones, des facteurs de coagulation et des facteurs immunitaires. Il fonctionne à la fois comme une glande endocrine et exocrine (Denbow, 2000).

## 2.1. Métabolisme du glucose et des lipides lors de l'embryogenèse

La teneur en glucides de l'œuf de poulet est très faible, entre 1 et 3% (Yadgary and Uni, 2012; Molenaar et al., 2013), et ils fournissent l'énergie nécessaire à la phase initiale du développement embryonnaire (Molenaar et al., 2013). Ensuite et jusqu'au milieu de l'incubation, ce sont les protéines qui sont utilisées comme source d'énergie (Freeman and Vince, 1974). Cependant, au cours de la seconde moitié du développement, période de croissance majeure, les lipides du sac vitellin sont utilisés de manière presque exclusive dans le métabolisme énergétique (Speake et al., 1998a). L'une des principales caractéristiques des premiers stades de développement est la formation d'une série de structures extra-embryonnaires, notamment les membranes amniotique, chorioallantique et du sac vitellin. Sur les 60 000 cellules présentes dans le blastodisque de l'œuf fraîchement pondue de poulet, environ 500 seulement servent au développement de l'embryon proprement dit, le reste donnant naissance aux membranes extra-embryonnaires (Slack, 1991). La membrane du sac vitellin est une structure très vascularisée qui se développe à partir de l'embryon pour envelopper tout le jaune. L'un des principaux rôles de cette membrane est l'absorption de lipides et d'autres constituants à partir du jaune et le transfert de ces composants dans la circulation embryonnaire. Le jaune de l'œuf a une importance vitale pour le développement de l'embryon, il constitue l'unique source de lipides pour la croissance du tissu embryonnaire (Speake et al., 1998a). Il contient approximativement 55% de protéines, 44% de lipides et 1% d'hydrates de carbone chez le poulet (sur la base du poids sec), les lipides constituant la principale source d'énergie estimée à plus de 90% de l'énergie totale utilisée lors du dernier tiers de l'embryogenèse (Moran, 2007; De Oliveira et al., 2008). Le poids moyen d'un œuf de canard Pekin est de 78,6g et est composé d'environ 29,6g de jaune (Ipek and Sozcu, 2017). Les œufs de canards ont une proportion de jaune (33,94% chez le canard commun) plus grande que les œufs de poules qui en sont composés en moyenne de 28-29% (Kaewmanee et al., 2009). Les lipides représentent en moyenne 13,5% du poids de l'œuf de canard et les triglycérides sont les lipides majoritaires dans le jaune d'œuf. La membrane du sac vitellin joue un rôle central dans l'utilisation des lipides par l'embryon. Elle a 3 fonctions principales : l'absorption des lipides du jaune, la réorganisation de la structure des lipides et l'assemblage des lipides modifiés en lipoprotéines pour la sécrétion dans la circulation embryonnaire.

Lorsque le foie est formé et fonctionnel, il prend le relai et joue un rôle primordial dans les métabolismes glucidique et lipidique (Ballard and Oliver, 1963; Nelson et al., 1966; Freeman, 1969; Noble and Cocchi, 1990; Griffin et al., 1992). Il exécute des processus essentiels à la synthèse (gluconéogenèse), et au stockage du glucose sous forme de glycogène (glycogénogenèse) et la dégradation du glycogène (glycogénolyse) permettant de réguler l'apport en glucose dans les tissus au cours du développement (figure 3).

Concernant le métabolisme des lipides, le foie de l'embryon présente une forte capacité de  $\beta$ -oxydation (Speake et al., 1998a), lui permettant de transformer les acides gras du sac vitellin en une forme d'énergie utilisable pour son développement. En fin de développement, l'embryon utilise une grande partie des lipides pour la néoglucogenèse mais des quantités importantes sont également converties en corps cétoniques pour être utilisés par le cœur, le cerveau et le rein embryonnaires (De Oliveira et al., 2008). Le glycérol issu de la dégradation hépatique des triglycérides du jaune est, en fin d'incubation, le substrat majeur pour la synthèse du glycogène hépatique et musculaire (Sunny and Bequette, 2011).

Entre 15 et 19 jours d'incubation, le foie est le siège d'un métabolisme actif conduisant au transfert de glucose et d'acides gras vers le muscle cervical («pipping muscle»). Celui-ci s'enrichit progressivement en glucose, en glycogène et en protéines en vue de l'éclosion (Pulikanti et al., 2010) car l'énergie fournie par les acides gras n'est plus suffisante et un catabolisme anaérobie du glucose qui est dépendant de la quantité de glucose stocké lors du développement sous forme de glycogène dans le foie et les muscles (De Oliveira et al., 2008) est nécessaire. Un jour après l'éclosion, les concentrations de glycogène dans le cœur et le foie diminuent de manière spectaculaire jusqu'à 40% et 16% des valeurs antérieures à l'éclosion, respectivement (Freeman, 1969). Les concentrations de glycogène dans le foie restent relativement faibles plusieurs semaines après l'éclosion et augmentent à partir de 4 mois jusqu'à l'âge adulte. Goodridge (Goodridge, 1968) a rapporté que l'activité du cycle de Krebs augmente tout au long de la période d'incubation, en particulier dans le foie, et continue d'augmenter lors de la croissance post-éclosion.

Les oiseaux présentent une glycémie basale jusqu'à deux fois plus élevée que celle des mammifères qui avoisine les 150-160 mg/dL à l'éclosion et atteignant des valeurs

comprises entre 190 mg / dL et 220 mg / dL en 4 à 6 semaines (Hazelwood and Lorenz, 1959; Farhat and Chavez, 2000), le jeûne exerçant peu d'effet sur sa variation.

## **2.2. Régulation hormonale des métabolismes glucidiques et lipidiques**

Les hormones jouent un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique car certaines activent la voie anabolique pour le stockage d'énergie et d'autres la voie catabolique pour la production d'énergie. La glycémie représente la concentration plasmatique de glucose, elle est ajustée sous l'action d'hormones sécrétées par les cellules endocrines du pancréas qui détectent les variations de la glycémie au cours d'une journée et agissent sur la gestion des stocks de glucose. Lors d'un repas, l'apport de glucose augmente la glycémie tandis qu'à jeun ou au cours d'un exercice physique, elle diminue. Les cellules, qui utilisent continuellement le glucose comme source d'énergie, ont des besoins différents selon leur activité. Les cellules musculaires, par exemple, consomment préférentiellement du glucose au cours d'un effort bref. Elles en font d'ailleurs des réserves rapidement mobilisables pour leur propre utilisation sous forme de glycogène. Les cellules du cerveau, quant à elles, ne peuvent pas faire de réserves et ont besoin d'être approvisionnées en glucose de façon continue, c'est pourquoi le système de régulation de la glycémie tend à maintenir constante la concentration plasmatique du glucose.

Les cellules alpha et bêta du pancréas sont les "capteurs" de la glycémie. Regroupées dans la partie endocrine du pancréas (les îlots de Langerhans), elles sont sensibles aux variations de la glycémie et sécrètent des hormones régulatrices, glucagon et insuline, en fonction de la glycémie (figure 3). Les cellules du foie, des muscles et du tissu adipeux sont les effecteurs de la régulation de la glycémie. Elles assurent le captage du glucose, en cas d'excès, et sa restitution par les cellules hépatiques uniquement, en cas de besoin.

Quand la glycémie augmente, l'insuline qui est une hormone hypoglycémisante est sécrétée en plus grande quantité par les cellules bêta. Cette hormone est déversée dans les nombreux capillaires sanguins à proximité des îlots de Langerhans et agit sur les organes effecteurs. Elle va alors réguler la glycémie en induisant le stockage de l'excédent de glucose sous forme de glycogène et triglycérides par la voie de la glycogénogenèse et de la lipogenèse. Le type de stockage dépend de l'intensité du pic d'insuline sécrétée. Si la glycémie augmente doucement, l'insuline est sécrétée en quantité modérée. Les glucides restent disponibles plus longtemps dans le sang et sont alors essentiellement stockés sous

forme de glycogène dans les muscles et le foie (glycogénogenèse), tant que les réserves ne sont pas pleines. Si l'apport de glucose se poursuit, il peut ensuite être stocké sous forme de lipides (triglycérides) dans le foie et les cellules adipeuses. Si la glycémie augmente fortement, le pancréas libère une quantité importante d'insuline. Les glucides sont alors stockés principalement sous forme d'acides gras, puis de triglycérides dans le foie et les cellules adipeuses. L'insuline intervient donc dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique. Elle joue un rôle anabolique majeur au sein de l'organisme pour la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques (Saltiel and Kahn, 2001).

Entre deux repas, ou même lors d'un jeûne, la glycémie diminue. Le glucagon est alors sécrété et prend le relais de l'insuline. C'est une hormone hyperglycémiant, sécrétée en plus grande quantité par les cellules alpha pancréatiques. Les récepteurs au glucagon sont majoritairement exprimés dans les cellules du foie (Svoboda et al., 1994; Wang et al., 2008). Sa fixation permet d'inhiber la glycogénogenèse et la lipogenèse et favorise l'hydrolyse des stocks de glycogène en glucose (glycogénolyse) et sa libération dans la circulation sanguine, ce qui entraîne une augmentation de la glycémie.

Ainsi, de nombreuses enzymes des processus glycolytiques et lipogéniques sont régulées par l'insuline et le glucagon (Saltiel and Kahn, 2001; Girard, 2009). Les enzymes Glucokinase, Phosphofructokinase de la glycolyse ou encore Acétyl-CoA carboxylase, Fatty acid synthase de la lipogenèse sont ainsi activées par l'insuline alors que les enzymes de la glycogénolyse comme la Glucose-6-phosphatase sont inhibées (figure 4). Dans le foie, l'insuline va se fixer sur son récepteur et induire un signal allant activer la translocation nucléaire d'un facteur de transcription appelé Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP1c), lui-même activant la transcription des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse (Figure 4) (Dentin et al., 2005). Récemment, l'insuline a été découverte comme ayant un rôle dans la clairance d'ApoB et donc dans la sécrétion des lipoprotéines (Haas et al., 2013). En effet, au niveau basal, l'insuline entraîne une diminution d'expression de MTTP et d'ApoB, de même qu'une réduction de la lipolyse du tissu adipeux réduisant ainsi l'efflux d'AG vers le foie. Chez l'individu diabétique (présentant une hyperglycémie et une résistance à l'insuline, bien que la concentration de cette hormone soit augmentée), l'insuline ne supprime plus la lipolyse dans les tissus adipeux tout en continuant de stimuler la lipogenèse dans le foie. L'ensemble de ces phénomènes conduit

à une hypertriglycémie et donc à une diminution de la clairance d'ApoB. Chez le poulet, en dépit de la concentration « normale » d'insuline plasmatique (3-4ng/mL), la glycémie reste très élevée (2g/L) (Simon et al., 2011). Chez le canard gavé, on observe une hyperinsulinémie associée à une hyperglycémie bien qu'une résistance à l'insuline n'ait pas été mise en évidence (Gontier et al., 2013). Le glucose peut également agir plus directement sur l'activation des gènes de la glycolyse ou de la lipogenèse. Ainsi, l'un des métabolites issus du cycle des pentoses phosphate, le Xylulose 5 Phosphate (X5P), va pouvoir activer la translocation nucléaire d'un facteur de transcription : Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) et induire l'expression de gènes cibles comme l'ACC ou la FAS (Figure 4) (Kabashima et al., 2003; Ishii et al., 2004).

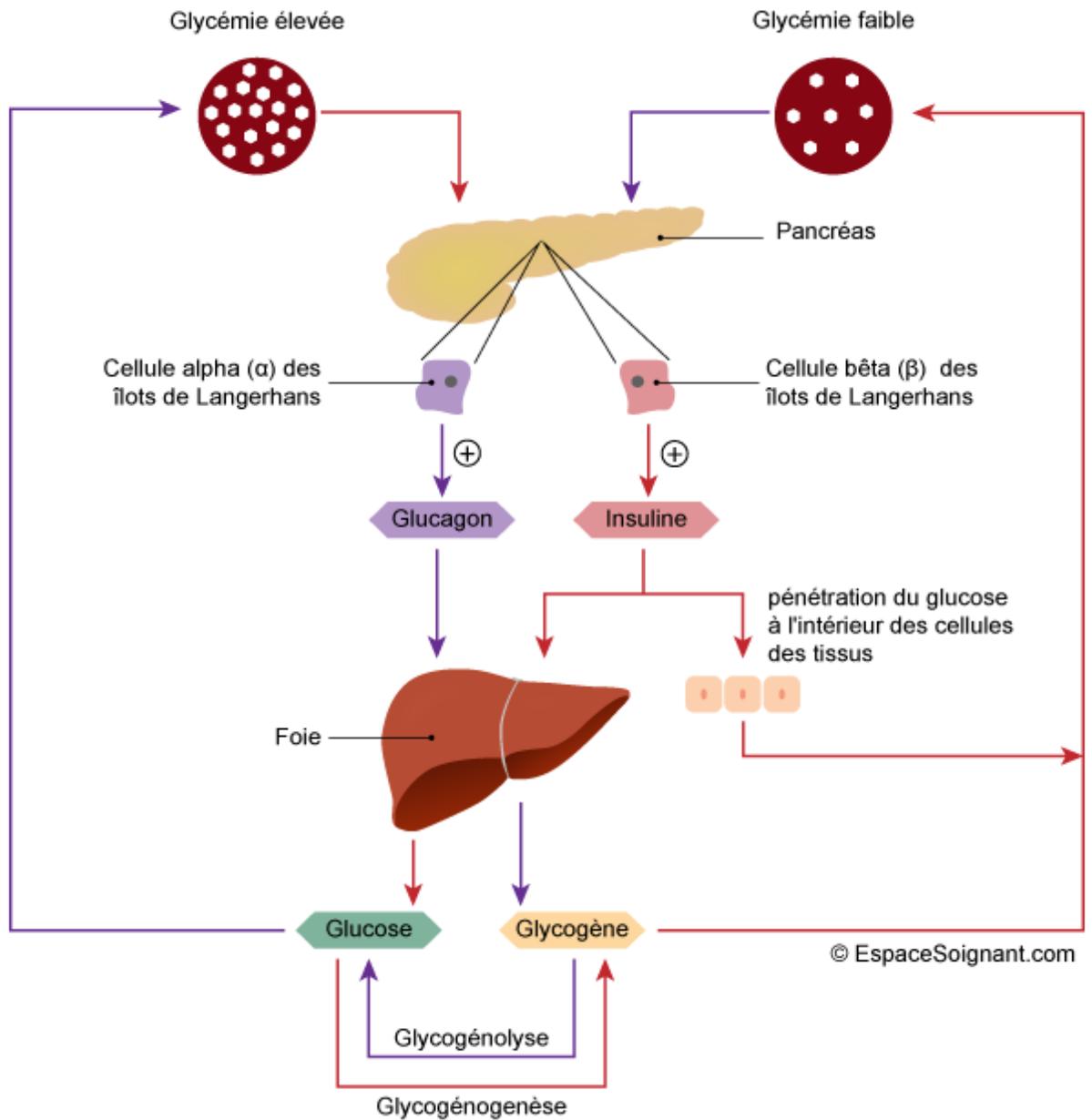


Figure 3: Régulation de la glycémie

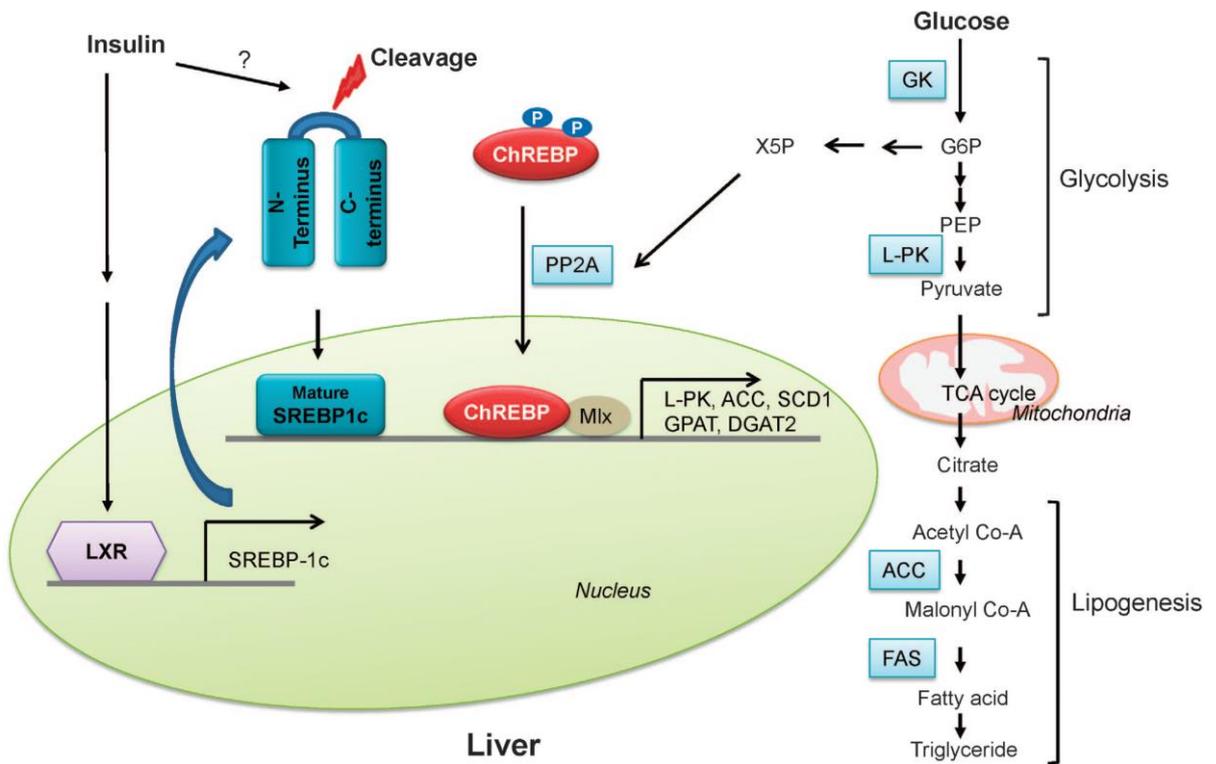


Figure 4: Régulation transcriptionnelle de la glycolyse et de la lipogénèse hépatique. (D'après Han et al. 2016)

## 2.3. Métabolisme du glucose chez l'adulte

### 2.3.1. Digestion, absorption et transport du glucose

Les glucides, en particulier l'amidon, représentent le principal nutriment d'élevage des palmipèdes quelle que soit la phase de production considérée. L'aliment de gavage des palmipèdes est composé à plus de 90% de maïs, lui-même composé majoritairement d'amidon (75,4% MS d'amidon FranceAgriMer, 2016). L'amidon est un glucide complexe de réserve chez les végétaux. Au cours de l'alimentation il va être hydrolysé par les amylases pancréatiques pour donner naissance à des dextrans puis, du maltose qui est rapidement dégradé par les enzymes intestinales (maltase et isomaltase) pour être absorbé sous forme de glucose par les cellules intestinales.

Cette absorption fait appel au principal transporteur de glucose au niveau intestinal : SGLT1 (Sodium Glucose Like Transporter 1) qui co-transporte le glucose et le sodium et présente une forte affinité au niveau apical des cellules intestinales, faisant face au lumen (figure 5) (Garriga et al., 1999). Du côté baso-latéral, le transport du glucose est sodium-indépendant et ce sont les transporteurs GLUT qui vont se charger de faire sortir le glucose de la cellule intestinale afin que ce dernier passe dans le sang. Jusqu'à aujourd'hui, 13 isoformes de transporteurs de glucose (GLUTs) ont été identifiées chez les mammifères (tableau 1) et sont exprimées de façon tissu-spécifique (GLUT 1-12 et HMIT) (Byers et al., 2017). Les humains ont un GLUT supplémentaire, GLUT14 qui est un duplicon de GLUT3 (Wu and Freeze, 2002). Les GLUT sont une famille de protéines de transport du glucose qui permettent le transport du glucose dans les deux sens à travers les membranes cellulaires par diffusion facilitée (Kono et al., 2005).

Les oiseaux expriment la majorité des GLUTs et la présence des GLUTs dans tous les tissus somatiques de l'organisme montre bien le rôle important du glucose dans tous l'organisme. Chez les mammifères, des défauts dans le transport du glucose ont été associés à des troubles métaboliques, à la résistance à l'insuline et au diabète (Unger, 1991; Kahn, 1998). Malgré l'importance essentielle de ces transporteurs, la connaissance des membres de GLUT chez les oiseaux est incomplète. Il est clair qu'il n'y a pas d'orthologue chez le poulet ni chez le canard des GLUT4 (Seki et al., 2003) et GLUT7 des mammifères (Byers et al., 2017). GLUT1 a été le premier transporteur de glucose caractérisé chez l'homme (Mueckler et al., 1985). Il est exprimé de façon constitutive dans tous les tissus et permet le transport basal du glucose essentiel à chaque cellule. Chez

l'oiseau, l'expression de GLUT1 a été détectée aussi bien dans le muscle, le cerveau, le foie ou encore le tissu adipeux (Kono et al., 2005; Sweazea and Braun, 2006). Même si des gènes codant pour GLUT1 ont été identifiés dans le foie des poulets de chair (Wang et al., 1994; Kono et al., 2005), la protéine GLUT1 n'est pas détectable dans le foie de poulet, suggérant qu'elle n'est pas un transporteur important pour ce tissu (Carver et al., 2001). GLUT1 a 95% de similarité avec la forme retrouvée chez les mammifères (Wagstaff et al., 1995).

Présente dans la membrane baso-latérale des cellules intestinales (Thorens et al., 1990), c'est notamment l'isoforme GLUT2 (Wang et al., 1994; Garriga et al., 1997) qui va permettre la sortie du glucose vers la circulation sanguine chez les mammifères et les oiseaux. GLUT2 est également présente dans la membrane des hépatocytes (Guillam et al., 2000), et chez le poulet, représente l'isoforme prédominante dans le foie (Garriga et al., 1997; Humphrey et al., 2004). Elle est également retrouvée dans le rein où elle pourrait jouer un rôle dans la réabsorption du glucose (Kono et al., 2005). Des niveaux faibles d'ARNm codant pour les transporteurs GLUT-3 et GLUT-8 ont également été détectés dans le foie de poulets de chair (Kono et al., 2005). Le glucose est transféré au foie grâce au système porte. Le foie, avec l'aide du pancréas, maintient une concentration constante de glucose sanguin. En fonction des besoins énergétiques le foie peut soit stocker le glucose sous forme de glycogène grâce à la voie de la glycogénogenèse ou sous forme de triglycérides grâce à la lipogenèse *de novo*, soit le cataboliser pour la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la glycolyse, au cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.

### **2.3.2. L'utilisation et le stockage du glucose**

#### **2.3.2.1. Stockage et utilisation du glycogène**

Le glycogène est une forme de stockage du glucose facilement mobilisable. C'est un très grand polymère ramifié de résidus de glucose. Par conséquent, le glycogène peut être décomposé pour produire des molécules de glucose et donc permettre de maintenir les niveaux de glucose dans le sang entre les repas.

**Tableau 1: Famille des transporteurs GLUTs et localisation chez les mammifères**

GLUT	Tissu	Spécificité
<b>classe 1</b>		
GLUT1	Ubiquitaire, hématies	Glucose/galactose
GLUT2	Intestin, reins, foie, cellule $\beta$ -pancréatique	Glucose/galactose/ fructose
GLUT3	Neurones	Glucose/galactose
GLUT4	Muscles ,graisse	Glucose/ pas galactose
<b>classe 2</b>		
GLUT5	Intestin, sperme	Fructose/(glucose)
GLUT7	Intestin	Glucose/fructose/ pas galactose
GLUT9	Reins, foie	Glucose/fructose/ pas galactose
GLUT11	Muscle, cœur, graisse, placenta, reins, pancréas	Glucose/fructose/ pas galactose
<b>classe 3</b>		
GLUT6	Cerveau, rate	Glucose
GLUT8	Testicules, cerveau, graisse, foie, rate	Glucose (fructose)
GLUT10	Cœur, poumons	Glucose/galactose/ pas fructose
GLUT12	Tissus insulino-sensibles	Glucose/galactose/ fructose

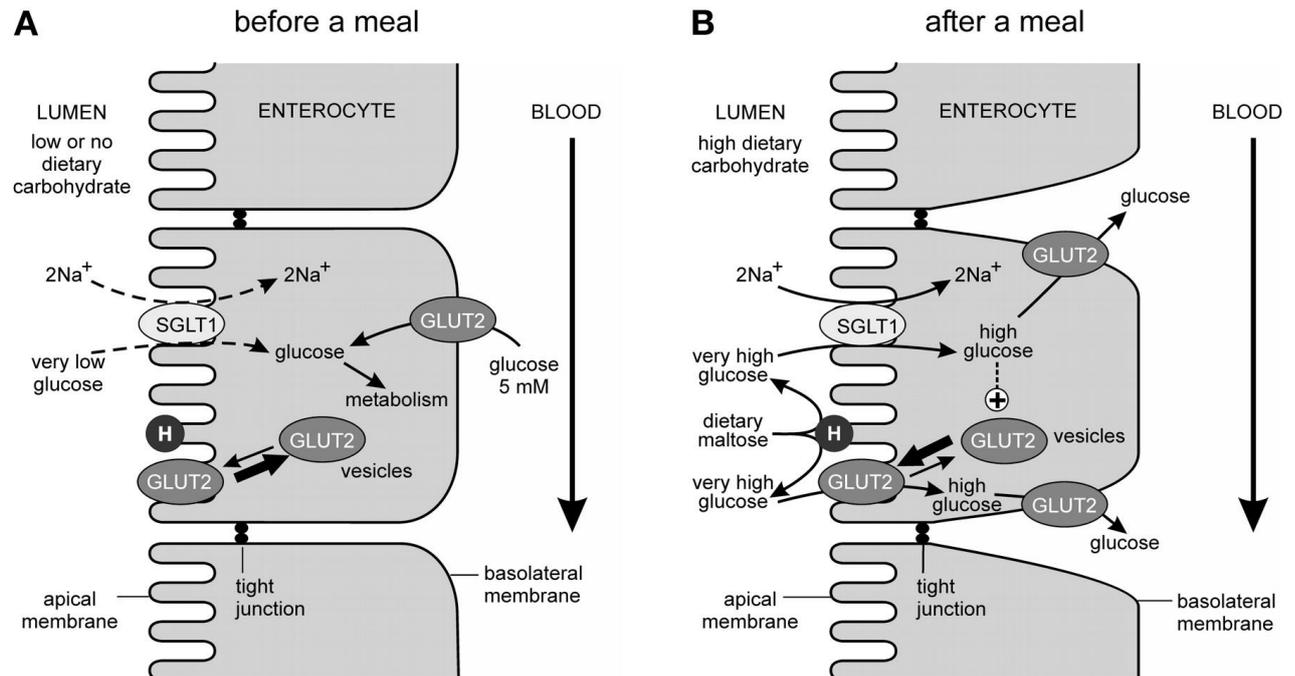


Figure 5: Transport apical et basolatéral du glucose. (Kellett and Brot-Laroche, 2005)

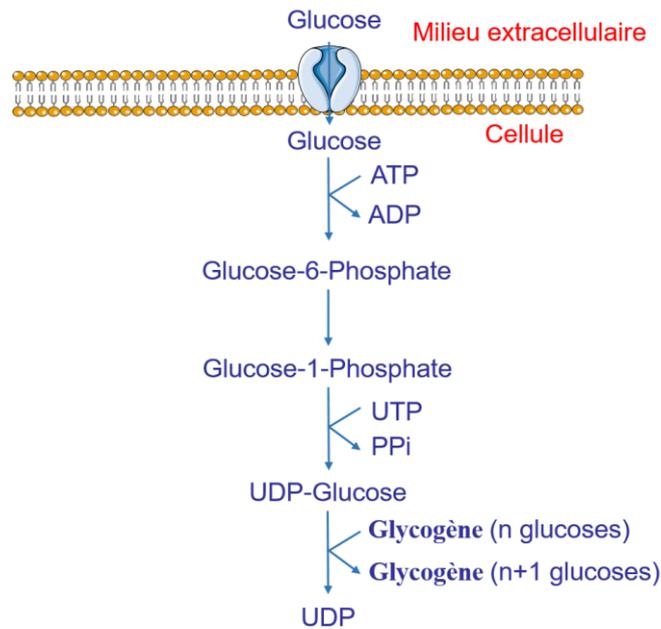


Figure 6: Synthèse du glycogène dans le foie par la voie de la glycogénogenèse

Quand la glycémie augmente, l'insuline va stimuler la glycogénogenèse (figure 6) qui a lieu principalement dans le foie et dans le muscle. La première étape de cette voie est la phosphorylation du glucose dans le cytosol (Lenzen, 2014) en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (hexokinase IV). Les hexokinases catalysent la première réaction de la glycolyse. Quatre isoenzymes (HK-I à IV) sont connues chez les vertébrés avec des distributions tissulaires différentes, toutes codées par des gènes différents. HK-I (cerveau), -II (muscle) et -III (erythrocytes) présentent une forte affinité pour le glucose et une inhibition par leur produit (le G6P) (Printz et al., 1993). En revanche, HK-IV (foie) autrement appelée glucokinase possède une faible affinité pour le glucose et son activité n'est pas inhibée par la présence de G6P. Son gène, de plus petite taille ne possède pas de domaine régulateur. Le G6P va devenir du glucose-1-phosphate sous l'action de la glucomutase, qui sera converti en UDP-glucose grâce à l'UDP-glucose pyrophosphorylase. La glycogène synthase catalyse la formation de la liaison  $\alpha$ -(1,4) entre un UDP-glucose et l'extrémité d'une chaîne de glycogène en cours de formation, avec libération de l'UDP.

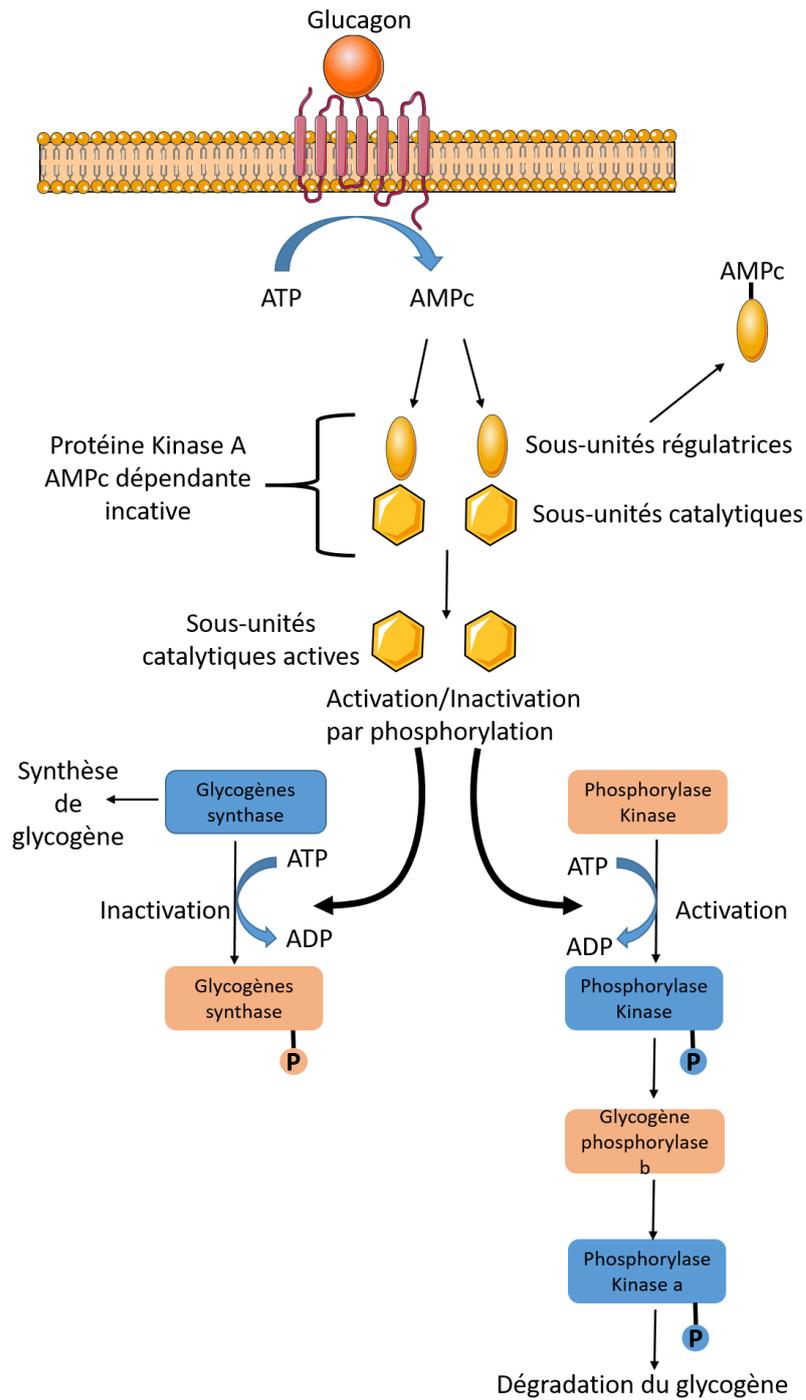
Quand la glycémie baisse la sécrétion de glucagon par le pancréas (Scott and Bloom, 2018) entraîne une augmentation de la concentration en AMPc, ce qui active une cascade de phosphorylations jusqu'à celle de la glycogène synthase. L'AMPc a pour fonction d'activer les protéines kinases A (PKA) dites AMPc dépendantes. Ces PKA sont formées de 4 sous-unités : 2 sous-unités catalytiques (C) et 2 sous-unités régulatrices (R). Dans cet état elles sont inactives. L'AMPc en se liant aux sous-unités R, dissocie et libère les sous-unités C qui deviennent actives. Les sous-unités C de la PKA ont pour fonction de phosphoryler les protéines (Keryer and Bailly, 1994). La phosphorylation des enzymes-clés par ce mécanisme permet d'activer ou d'inhiber les réactions catalysées et donc de réguler les voies métaboliques (Krebs and Beavo, 1979). Une fois la glycogène synthase phosphorylée, son action, et donc l'allongement du glycogène s'arrête (figure 7). De la même façon, toujours sous l'action du glucagon en période de jeûne lorsque la glycémie baisse, l'AMPc peut activer l'action d'enzymes impliquées dans la dégradation du glycogène en glucose (glycogénolyse) et ainsi libérer le glucose dans le sang. En réponse à la demande immédiate de glucose, le foie peut aussi convertir certains acides aminés et lipides, ainsi que l'acide lactique, en glucose (néoglucogenèse)(Scanes, 2015; Petersen et al., 2017).

### 2.3.2.2. Catabolisme du glucose

La glycolyse est l'unique voie du catabolisme du glucose chez tous les organismes, y compris les oiseaux. Avec le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire, ils vont permettre la production d'énergie sous forme d'ATP à partir du glucose. La glycolyse est cytoplasmique, et consiste en une succession de réactions enzymatiques (Figure 8). A partir d'une molécule de glucose, elle fournit deux molécules de pyruvate et deux d'ATP. Pour permettre son entrée dans les voies métaboliques, le glucose est d'abord phosphorylé, par une hexokinase (HK) en glucose-6-phosphate (G6P) et ne pourra plus ressortir de la cellule sous cette forme.

Une fois formé, le G6P va ensuite être catalysé par la phosphogluco isomérase (PGI) en fructose-6-phosphate, lequel est alors phosphorylé en fructose-1,6-bisphosphate par la 6-phosphofructose-1-kinase (6PF1K), seconde enzyme clé de la glycolyse. La pyruvate kinase (PK) est la troisième enzyme clé de la glycolyse dont elle catalyse la dernière étape, à savoir, la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate. Le pyruvate issu de la glycolyse passe du cytoplasme à la mitochondrie où il sera transformé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA qui va entrer dans le cycle de Krebs (Figure 8). Une cascade de réactions enzymatiques conduit à la formation d'intermédiaires énergétiques qui serviront à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire.

L'acétyl-CoA peut également servir de substrat de base à la lipogenèse *de novo* pour la synthèse d'acides gras. Cette aptitude dans le foie est plus importante chez les oiseaux (Pearce, 1980; Saadoun and Leclercq, 1987) que chez d'autres espèces comme le porc ou les ruminants dont le site majeur de la lipogenèse *de novo* se situe dans les tissus adipeux (Hanson and Ballard, 1967; Mourot and Kouba, 1999). Ainsi, le foie est responsable de plus de 70% de la lipogenèse endogène chez les oiseaux (Saadoun and Leclercq, 1987) et 75% du glucose entre dans la synthèse *de novo* des lipides, comme démontré par Evans (1972) sur des explants cellulaires hépatiques de canards. Cette étude montre bien l'importance de la lipogenèse *de novo* dans le métabolisme hépatique des palmipèdes.



**Figure 7: Inactivation de la synthèse de glycogène**

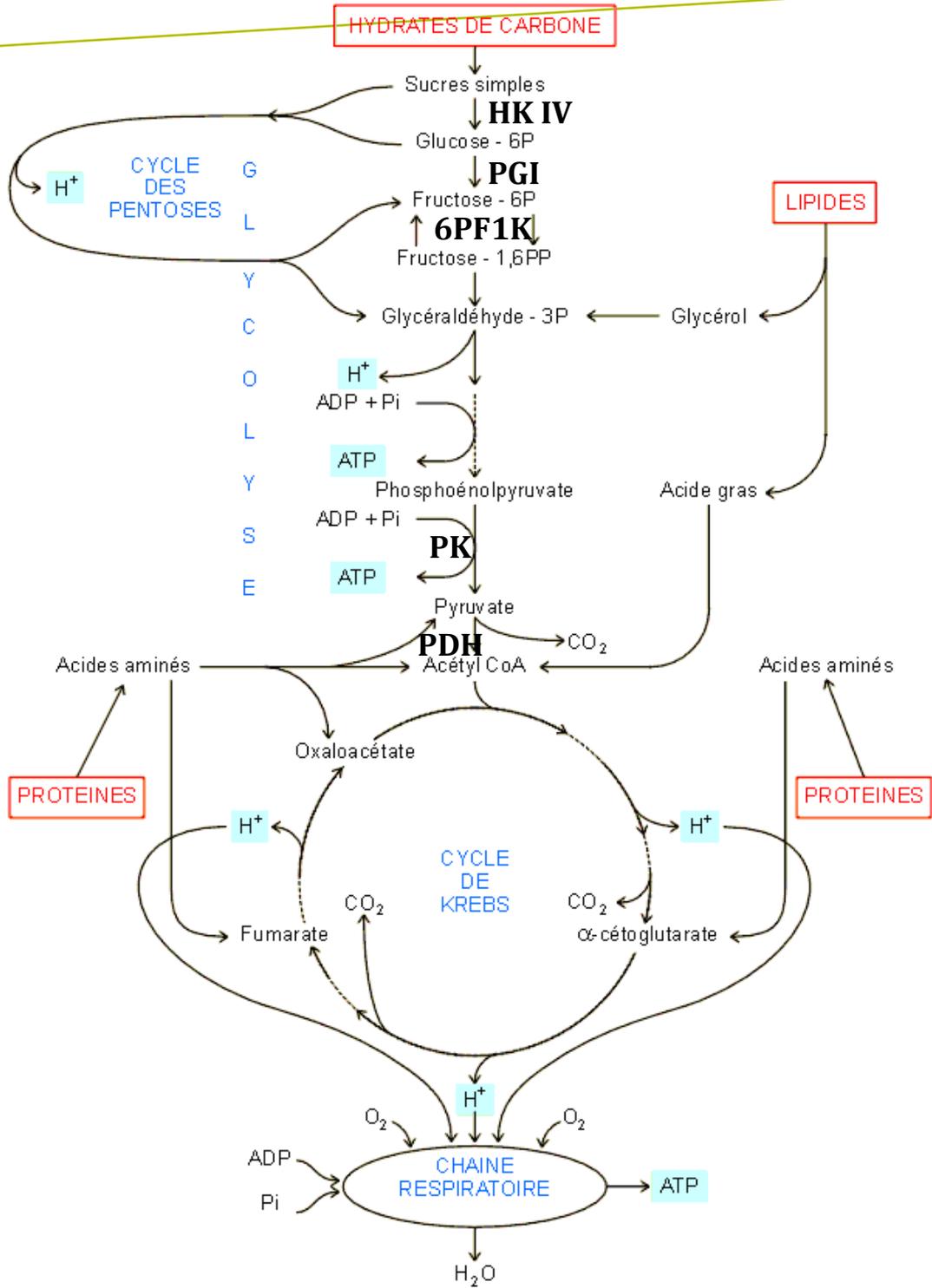


Figure 8: Glycolyse et Cycle de Krebs

## 2.4. Le métabolisme lipidique

Les lipides constituent une réserve d'énergie primordiale qui permet de couvrir les besoins de l'organisme. Ils peuvent avoir deux origines : exogène (provenant de l'alimentation) ou endogène (synthétisés par la lipogenèse).

Les palmipèdes et notamment les canards sont principalement nourris avec du maïs, que ce soit lors de la phase d'élevage ou au cours du gavage, composé à plus de 70% d'amidon, glucide complexe hydrolysé en glucose par les enzymes intestinales. L'apport de glucose par cette alimentation peut alors stimuler la lipogenèse *de novo* par le biais des hormones pancréatiques. La majorité des besoins en lipides est donc apportée par la lipogenèse *de novo* (DNL) qui utilise des résidus acétates fournis par le catabolisme glucidique (glycolyse).

Chez les oiseaux, c'est au niveau des hépatocytes que se produit l'essentiel de la lipogenèse (Saadoun and Leclercq, 1987). Les lipides peuvent ensuite être exportés vers les tissus extra-hépatiques sous forme de lipoprotéines par la voie plasmatique. Le foie joue un rôle primordial dans le métabolisme lipidique en fournissant des lipides destinés à être utilisés par tous les tissus et par le foie lui-même (Hermier, 1997). Les graisses métabolisées dans le foie proviennent donc principalement de deux sources: les graisses alimentaires et les graisses issues de la lipogenèse *de novo* (provenant des glucides alimentaires).

### 2.4.1. Digestion, absorption et transport des lipides

Contrairement aux glucides, les lipides représentent une faible part des aliments des palmipèdes tant en élevage qu'en gavage (3,7% de matières grasses brutes). Comme chez les mammifères, la digestion et l'absorption des graisses alimentaires chez les espèces aviaires se produisent dans l'intestin grêle (Tancharoenrat et al., 2014). La forme majoritaire des lipides alimentaires correspond aux triglycérides, qui ne sont pas absorbables en tant que tels. L'utilisation des triglycérides repose donc sur leur hydrolyse par les lipases gastriques et pancréatiques, en mono- et diglycérides, acides gras et glycérol. Les monoglycérides et acides gras libres vont alors s'associer avec le cholestérol et les sels biliaires pour former des micelles. Ces micelles seront alors absorbées au niveau de l'intestin par les entérocytes de façon passive ou grâce à l'action de la 'fatty acid binding protein' (FABP) (Besnard et al., 1997). Une fois dans la muqueuse intestinale, les

acides gras à courte chaîne (inférieure à 12 atomes de carbone) sont directement sécrétés dans le système porte hépatique et associés à l'albumine sérique pour être transportés jusqu'au foie (Hocquette and Bauchart, 1999). Les acides gras à longue chaîne (supérieure à 12 atomes de carbone) sont eux en partie ré-estérifiés en triglycérides. Après s'être associés à des molécules de phospholipides, de cholestérol, d'esters de cholestérol et d'apolipoprotéines, ces triglycérides seront sécrétés par les entérocytes sous forme de portomicrons (Bensadoun and Rothfeld, 1972) directement dans le système sanguin porte (au lieu du système lymphatique), car le système lymphatique intestinal des oiseaux n'est pas aussi développé que celui des mammifères. Les portomicrons sont des lipoprotéines riches en triglycérides (90%) combiné à du cholestérol, des lipoprotéines et des phospholipides libres et estérifiés (Griffin et al., 1982; Hermier, 1997), leur composition est très proches des chylomicrons des mammifères (Griffin et al., 1982). Cependant leurs parcours métaboliques diffèrent, puisque à partir du système sanguin porte, la plupart des portomicrons passent dans le foie avant d'atteindre le reste de la circulation générale. Ainsi, les lipides qu'ils transportent vont pouvoir être captés et utilisés par le foie dès ce premier passage. Ceci est particulièrement important pour les acides gras polyinsaturés essentiels (dans l'aliment de gavage, composé essentiellement de maïs, l'acide linoléique, C 18:2 n-6, représente plus de la moitié des acides gras)(Baldwin and Sniegowski, 1951; Morand-Fehr and Tran, 2001). Cette caractéristique unique prédispose les oiseaux à une accumulation de graisse dans le foie (Cherian et al., 2002). Les hépatocytes peuvent stocker les triglycérides contenus dans les portomicrons, métaboliser les acides gras en ATP grâce à la  $\beta$ -oxydation, synthétiser des lipoprotéines pour le transport des lipides et des phospholipides (Scott et al., 1969).

#### **2.4.2. Utilisation des lipides alimentaires**

Les lipides pourront être utilisés pour la production d'énergie, soit en étant totalement dégradés sous forme de CO<sub>2</sub> via la  $\beta$ -oxydation, soit en étant partiellement dégradés en corps cétoniques via la cétogenèse (figure 9). Dans les tissus extrahépatiques, ces corps cétoniques sont reconvertis en acétyl CoA qui peut alors entrer dans le cycle de Krebs (Puchalska and Crawford, 2017). L'acétoacétate et le D- $\beta$ -hydroxybutyrate sont une source d'énergie dans de nombreux tissus en particulier lorsque le taux de glucose sanguin diminue.

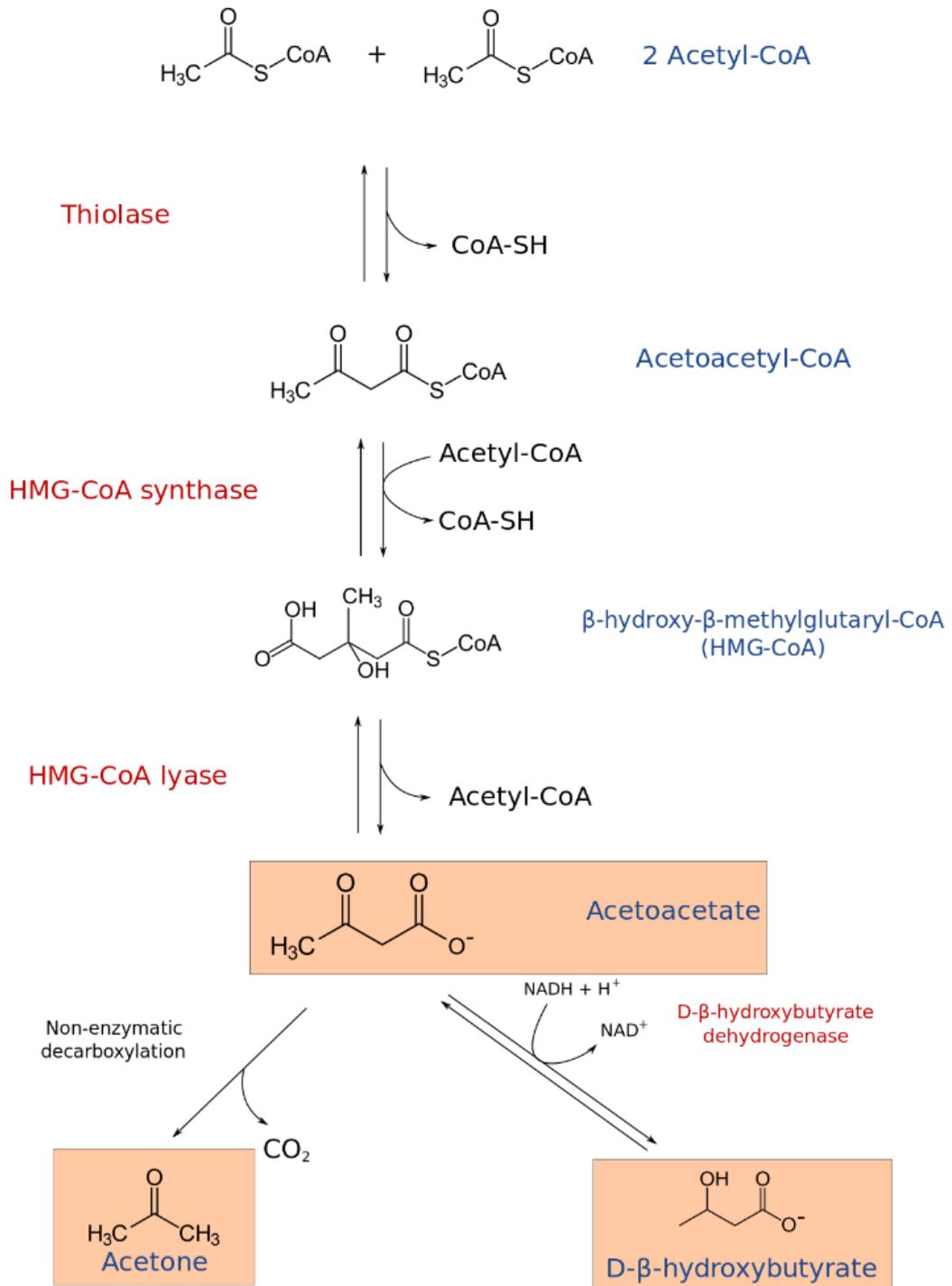
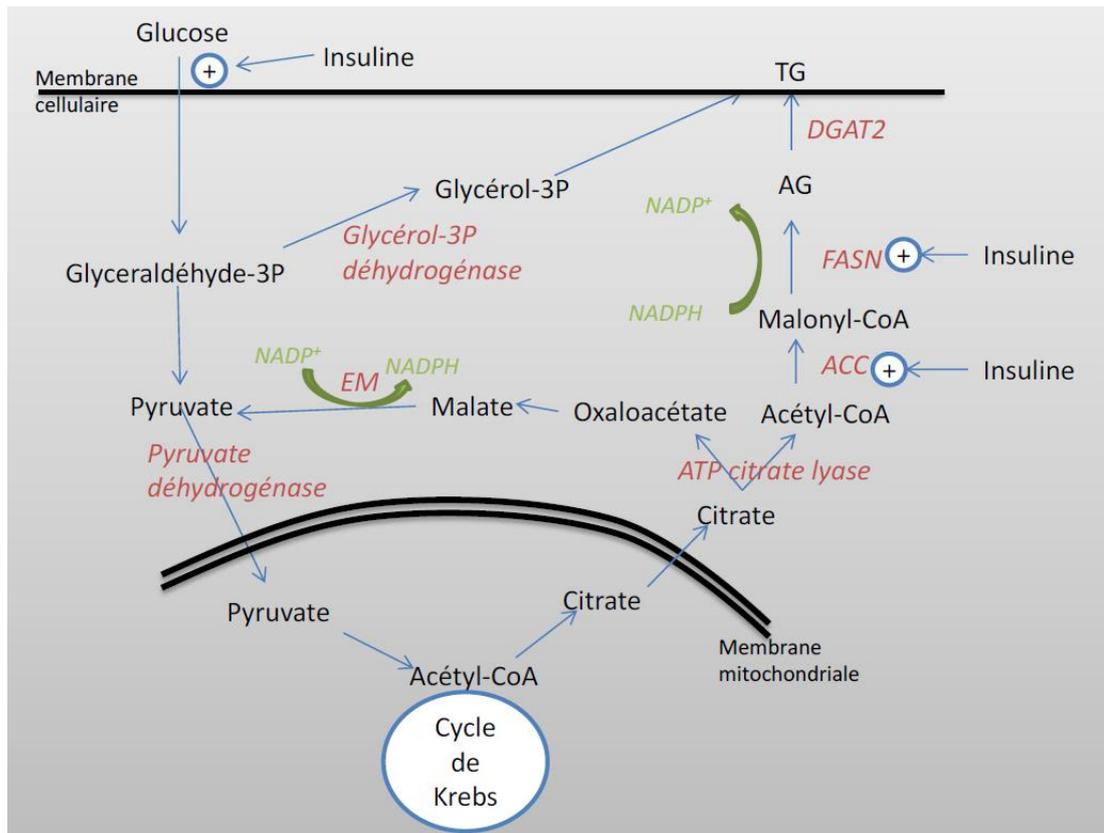


Figure 9: la cétogénèse

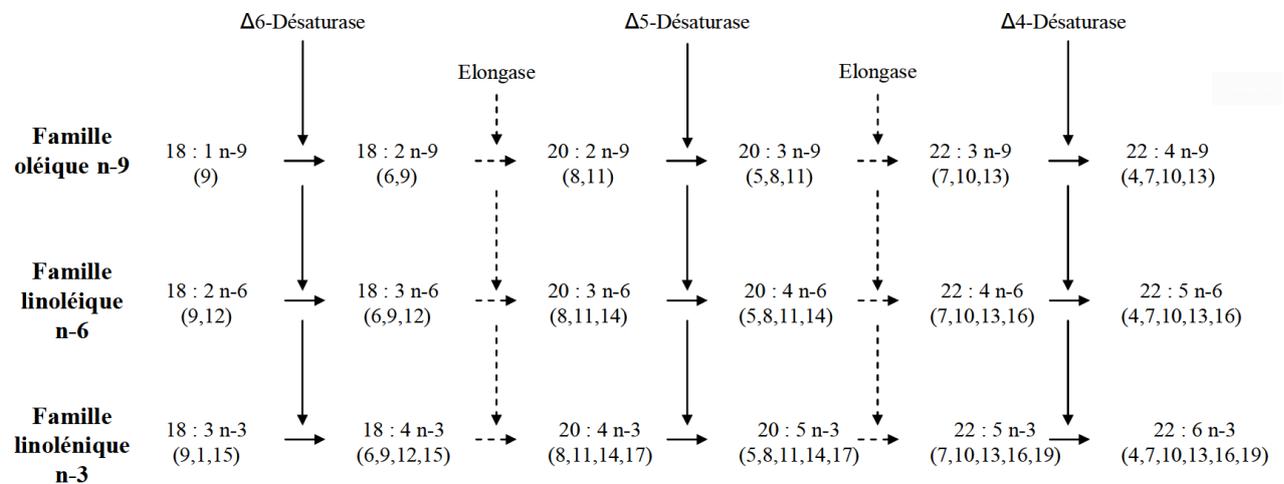
### 2.4.3. La lipogenèse *de novo*

Le pyruvate synthétisé lors de la glycolyse est transféré dans la mitochondrie afin d'initier le cycle de Krebs (figure 9). Le citrate mitochondrial peut alors soit poursuivre le cycle de Krebs, soit être transféré vers le cytoplasme pour être scindé en oxaloacétate et en acétyl-CoA par la citrate lyase. D'un côté, l'oxaloacétate sera transformé successivement en malate par la malate déshydrogénase puis en pyruvate par l'enzyme malique (EM). D'un autre côté, l'acétyl-CoA initie le processus de synthèse des acides gras (**AG**) (figure 10).

La régulation de la lipogenèse *de novo* répond aux besoins de l'organisme selon les périodes d'alimentation ou de jeûne. Elle augmente lorsque l'apport calorique dépasse les besoins énergétiques et conduit ainsi à la mise en réserve des surplus nutritionnels sous la forme de triglycérides. L'insuline, par l'activation de l'ACC (acétyl-CoA carboxylase) et de la FASN (fatty acid synthase), stimule la lipogenèse, alors que le glucagon l'inhibe. L'ACC joue un rôle essentiel dans la régulation de la synthèse et la dégradation des acides gras (Figure 10). En présence d'ATP cette enzyme catalyse la première étape de la synthèse d'acide gras grâce à la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA dans le cytoplasme. Ce Malonyl CoA va alors être pris en charge par la Fatty Acid Synthase (FASN) pour former de l'acide palmitique ou palmitate (Mayes, 1996) qui est le premier acide gras formé par la lipogenèse *de novo* avec 16 atomes de carbone. Ensuite, à partir de l'acide palmitique, formé par la lipogenèse *de novo*, ou les acides gras essentiels fournis par l'alimentation (acide linoléique et linoléique), les autres acides gras à longue chaîne sont synthétisés grâce à l'action d'élongases et de désaturases du réticulum endoplasmique. Le palmitate (C16 :0) ainsi obtenu va subir l'action d'une élongase, l'Elongation of very long chain fatty acids protein 6 (Elovl 6), qui va allonger les chaînes hydrocarbonées afin d'obtenir des AG à longues chaînes comme l'acide stéarique (C18 : 0). L'acide stéarique ainsi formé va pouvoir être désaturé par la Stéaroyl CoA Désaturase 1 (SCD1) en acide oléique (C18 : 1) un AG mono-insaturé (AGMI) (figure 11) (Ntambi, 2004; Sampath et al., 2007). Les AG ainsi formés vont pouvoir servir de substrat énergétique à la cellule, être exportés vers d'autres tissus ou être estérifiés en TG pour permettre leur stockage.



**Figure 10: Processus de la lipogenèse.** Les enzymes sont renseignées en rouge, les métabolites intermédiaires sont en noir. EM = Enzyme malique, 3P = 3 phosphate ; ACC = Acétyl CoA Carboxylase ; FASN = Fatty Acid Synthase ; DGAT2 = Diglycerol acétyl transférase 2 ; AG = Acide Gras ; TG = Triglycéride. L'insuline active l'ACC et la FASN ainsi que l'entrée du glucose dans la cellule. (D'après la Thèse de Yoannah FRANCOIS)



**Figure 11: Synthèse des acides gras polyinsaturés à chaîne longue.** (D'après la Thèse de L. Theron)

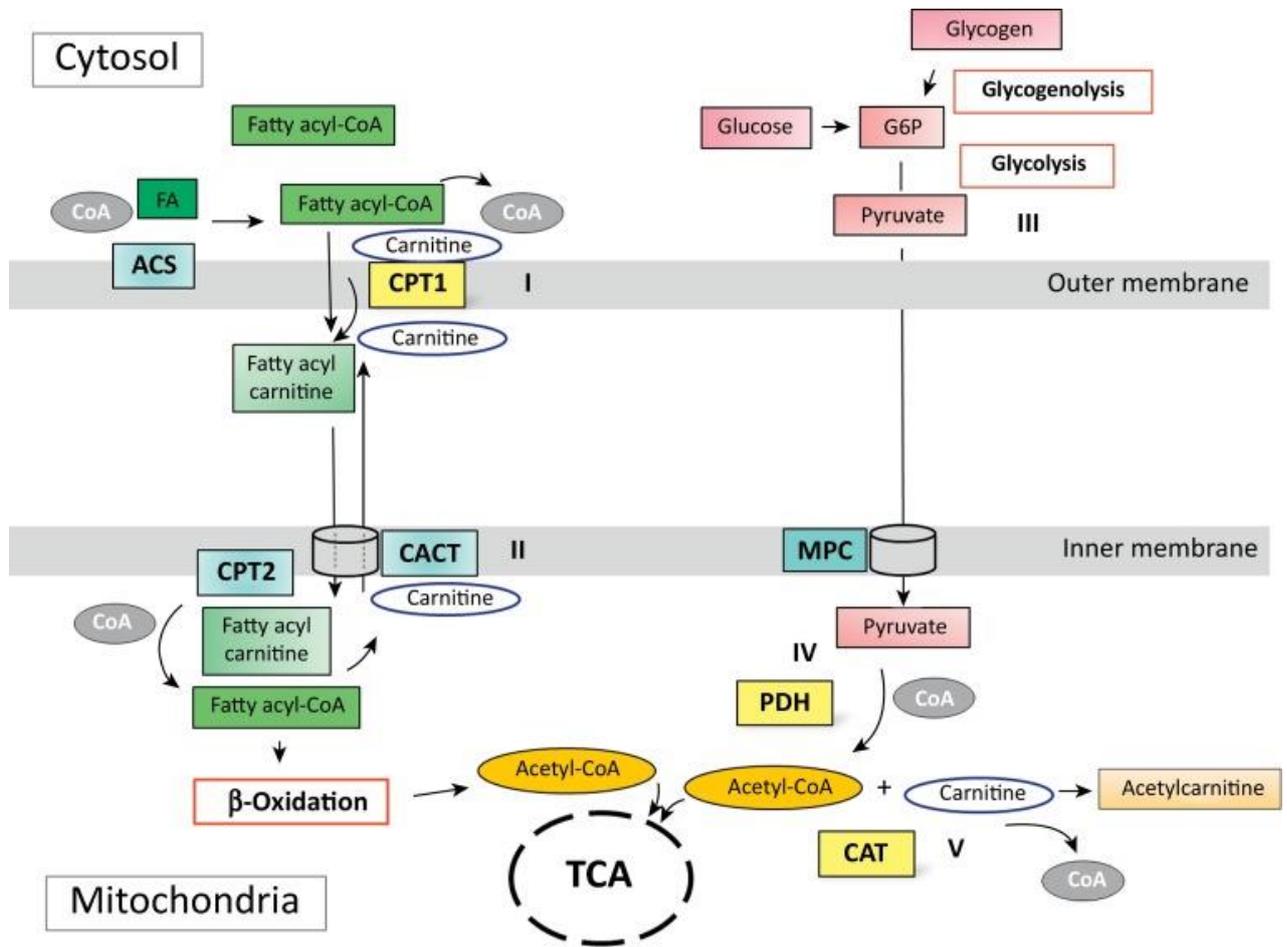
Les chiffres entre parenthèses indiquent les positions des doubles liaisons par rapport au carbone carboxylique (1). La nomenclature n-9, n-6 et n-3 indique la position de la double liaison la plus proche du carbone méthylé (n<sup>ème</sup> carbone) par rapport à celui-ci).

#### 2.4.4. La $\beta$ -oxydation des acides gras

Les AG, néosynthétisés ou alimentaires, peuvent être oxydés au sein de la mitochondrie dans le but de produire de l'énergie (Figure 12). La  $\beta$ -oxydation constitue la principale voie de dégradation des acides gras (Bartlett and Eaton, 2004). C'est une voie métabolique essentielle pour l'homéostasie énergétique des organes tels que le foie, le cœur et les muscles squelettiques (Houten and Wanders, 2010). Cette voie est très active en période de jeûne, notamment lorsque la lipolyse (c'est-à-dire l'hydrolyse de triglycérides en acides gras et glycérol à partir du tissu adipeux) est intense et libère de grandes quantités d'AG libres dans le sang.

C'est une succession de réactions au cours desquelles les AG sont découpés progressivement en molécules d'Acétyl CoA. La  $\beta$ -oxydation débute dans le cytoplasme, au niveau de la membrane externe mitochondriale, où les acides gras libres sont activés par des acyl-CoA synthétases. Les Acyl CoA à courte chaîne (< à 6 carbones) et moyenne chaîne (> à 12 carbones) carbonées peuvent entrer passivement au sein de la mitochondrie, contrairement aux Acyl CoA à chaîne longue (> à 20 carbones) qui nécessitent un système de transport pour traverser les deux membranes mitochondriales.

Ce système de transport est composé de 3 protéines. Il s'agit d'un complexe enzymatique rassemblant la Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT1), la Carnitine Acyl-Carnitine Translocase (CACT) et par la Carnitine Palmitoyl Transferase 2 (CPT2) qui permet ainsi aux AG de franchir les membranes mitochondriales. La  $\beta$ -oxydation génère alors de l'acétyl-CoA et du NADH qui seront utilisés dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie. La CPT1 est considérée comme l'enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale dans le foie (Eaton, 2002) et est inhibée, chez les mammifères, par le Malonyl CoA (McGarry and Brown, 1997). La  $\beta$ -oxydation va donc se dérouler dans la matrice mitochondriale sous l'action de diverses enzymes. L'Acyl-CoA Dehydrogenase (ACAD) effectue la première étape, elle permet de libérer des cofacteurs utilisables par la chaîne respiratoire dans la production d'énergie.



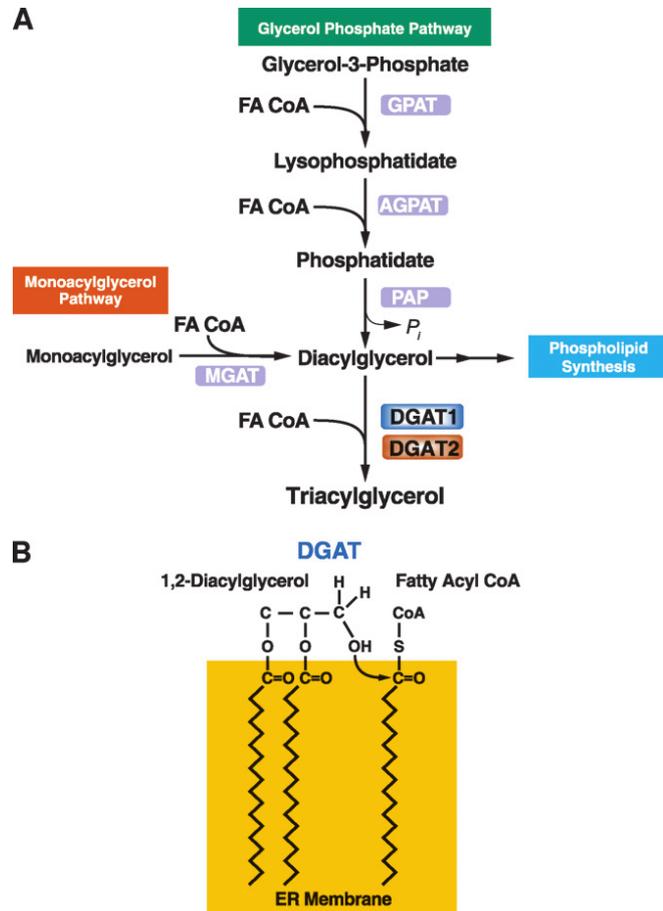
Trends in Endocrinology & Metabolism

Figure 12: B-oxydation des acides gras. (d'après Lundsgaard et al. 2017)

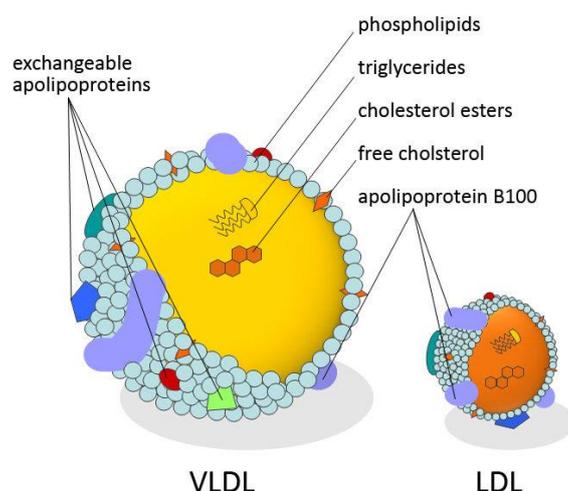
#### 2.4.5. Le transport des lipides

Pour permettre leurs transports les AG doivent être estérifiés en triglycérides (TG). Cette étape se passe au sein des hépatocytes via l'action successive de 4 enzymes (Figure 13). Parmi celles-ci, la glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) ou la diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2). Elles vont créer une liaison ester entre un alcool et un AG, ces réactions permettent la formation de TG qui constituent la majorité des lipides stockés lors de la stéatose (>95%) (Fernandez et al., 2011). Les TG peuvent alors être intégrés dans la formation des lipoprotéines, essentiellement des Very Low Density Lipoprotein (VLDL), en vue de leur exportation. En effet, chez l'oiseau, à la différence des mammifères, les lipoprotéines sont préférées aux AG libres pour le transport des lipides (Weber, 2009). Les lipoprotéines sont constituées d'un noyau apolaire de triglycérides et d'esters de cholestérol entourés d'une couche hydrophile constituée de phospholipides, de cholestérol et d'apolipoprotéines. Chez les oiseaux, on distingue 5 catégories de lipoprotéines (Hermier, 1988) classées ici par ordre croissant de leur teneur en TG : High Density Lipoprotein (HDL), Low DL (LDL), Intermediate DL (IDL) et Very Low DL (VLDL) et les portomicrons.

- Les VLDL sont sécrétées par le foie, elles sont très riches en triglycérides et pauvres en cholestérol. Elles ont pour rôle de transporter les acides gras du foie vers les tissus périphériques qui pourront être utilisés pour la production d'énergie ou le stockage de composés énergétiques.
- Les HDL sont aussi sécrétées par le foie et sont riches en cholestérol et en protéines mais pauvres en triglycérides. Les HDL ont également pour fonction le transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques, en plus de son re-captage vers le foie. De même, la fraction protéique de ces lipoprotéines, les apolipoprotéines, sont également synthétisée par le foie. L'Apolipoprotéine B (ApoB) et l'ApoAI sont les constituants protéiques majeurs des VLDL et HDL (respectivement) chez le poulet (Siuta-Manganot et al., 1982; Banerjee and Redman, 1983).
- Les LDL sont sécrétées par le foie. Les IDL et les LDL sont des transporteurs du cholestérol.
- Les portomicrons, sécrétés par les entérocytes, assurent le transport des acides gras à longue chaîne et du glycérol de l'intestin vers les tissus périphériques.



**Figure 13: Synthèse des Triglycérides et de l'acyl-CoA et action des enzymes diacylglycerol acyltransferase (DGAT).** A: Triacylglycerols (triglycérides) sont les produits finaux d'une voie à plusieurs étapes. DGAT1 ou DGAT2 catalise la réaction finale. B: Les enzymes DGAT catalysent la formation d'une liaison ester entre un Fatty Acyl CoA et le groupe hydroxyle libre du diacylglycérol. La figure montre que cette réaction se produit à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). GPAT, glycerol-phosphate acyltransferase; AGPAT, acylglycerol-phosphate acyltransferase; PAP, phosphatidic acid phosphohydrolase; MGAT, acyl CoA: monoacylglycerol acyltransferase. (Yen et al., 2008)



**Figure 14: Composition des lipoprotéines. Schéma de la composition en lipide et apolipoprotéine des lipoprotéines, ici illustrés par VLDL et LDL.**

Les TG synthétisés dans le foie par la lipogénèse peuvent soit être stockés au sein même du foie soit exportés vers les tissus périphériques. L'exportation des TG se fait via la formation des VLDL. Une fois les acides gras estérifiés en TG, ceux-ci sont tout d'abord pris en charge par la Protéine Microsomale de Transfert des TG (MTTP) au sein du réticulum endoplasmique (RE) qui a pour fonction de transporter essentiellement les molécules hydrophobes (TG et EC) jusqu'au site d'assemblage des lipoprotéines (Gibbons, 1990). Il a été rapporté par Hussain et al. (2012) qu'une déficience en MTTP chez la souris augmentait la concentration en TG et en cholestérol hépatiques, confirmant son rôle primordial dans l'export de ces lipides. La formation des VLDL met en jeu l'apolipoprotéine B (apoB), une protéine constitutive de l'enveloppe hydrophile des lipoprotéines. C'est la protéine majoritaire de la structure des VLDL (figure 14) (Olofsson and Boren, 2005). Dans la lumière du RE, elle est liée aux TG apportés par MTTP ainsi qu'aux autres composants pour donner naissance aux VLDL. L'ApoB est synthétisée en excès pour répondre aux besoins de sécrétion des VLDL. Cette exportation des TG par les VLDL est régulée par l'insuline. Différentes études ont ainsi montré le rôle prépondérant de l'insuline dans l'inhibition de la formation des VLDL (Haas et al., 2013) *in vitro* (Jackson et al., 1990; Salhanick et al., 1991) et *in vivo* (Lewis et al., 1993; Malmstrom et al., 1998). L'insuline peut inhiber la production de VLDL hépatiques par un certain nombre de mécanismes, notamment la régulation négative de l'expression génique de MTTP (Au et

al., 2003), l'augmentation de la dégradation de l'apoB dans les hépatocytes (Sparks and Sparks, 1989) et l'inhibition de la maturation des VLDL (Brown and Gibbons, 2001).

#### **2.4.6. Le captage des lipides en périphérie**

Les VLDL, une fois formées au sein du RE puis de l'appareil de Golgi, sont ensuite exportées dans le sang où leurs triglycérides sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) en glycérol et acides gras libres (Butterwith, 1988; Bensadoun, 1991; Cooper et al., 1992) pour pouvoir franchir les membranes des cellules cibles. Une partie de la surface des VLDL (comprenant des phospholipides et des apolipoprotéines) est transférée aux HDL dans le sang. La LPL est une enzyme lipolytique synthétisée par les cellules parenchymateuses des tissus extra-hépatiques, en particulier les cellules adipeuses et musculaires. La LPL est ancrée à la surface des cellules endothéliales des capillaires des tissus périphériques par des groupements Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG) (Wang and Eckel, 2009) et hydrolyse les TG des VLDL en AG libres et glycérol. Les AG issus de l'hydrolyse des VLDL sont alors soit stockés par le tissu adipeux soit utilisés par les muscles squelettiques comme source d'énergie, soit réutilisés pour la synthèse hépatique des VLDL. L'activité de la LPL est également sous le contrôle des hormones pancréatiques. Une partie des VLDL est aussi dégradée en lipoprotéines de plus petite taille et moins riches en triglycérides, les IDL (Intermediate Density Lipoprotein) puis en LDL (Low Density Lipoprotein) essentiellement sous l'action de la lipase hépatique sécrétée par le foie. Une petite partie des IDL est directement captée par le foie par l'intermédiaire des récepteurs aux LDL. Après action de la LPL, les IDL, les LDL et les particules résiduelles seront captées par des récepteurs spécifiques (hépatiques et extra-hépatiques), internalisées par endocytose puis dégradées dans des vésicules lysosomales. Les LDL représentent le produit final de la cascade métabolique VLDL-IDL-LDL. Les LDL sont les transporteurs majoritaires du cholestérol dans l'organisme.

Les AG vont être captés par des transporteurs d'AG spécifiques tels que les Fatty Acid Binding Protein (FABP) ou la Fatty Acid Translocase homologue de l'antigène CD36 (FAT/CD36) (Abumrad et al., 1998; Stahl, 2004). Les FABP ont d'abord été identifiés dans le foie de rat (Stremmel et al., 1985) et 12 isoformes ont été décrites (Liu et al., 2008). Chez le canard, la forme hépatique de FABP a également été retrouvée dans le muscle ou encore le tissu adipeux (He et al., 2013). Plus particulièrement, l'isoforme 4 a été démontrée comme surexprimée dans le muscle et le foie de canards mulard gavés en

comparaison des canards de Barbarie et Pekin (Saez et al., 2008; Tavernier et al., 2017a). FAT/CD36, quant à lui, a une expression hépatique basale faible mais qui augmente sous régime riche en graisses chez la souris et serait à l'origine de dyslipidémies (Koonen et al., 2007). Chez l'oiseau, FAT/CD36 a été démontré comme favorisant le transport de l'acide linoléique contribuant ainsi à un dépôt de lipides plus important dans le muscle (Guo et al., 2013). Enfin, ces transporteurs ont déjà été mis en lumière par des études s'intéressant à la migration des oiseaux. En effet, ces deux transporteurs présentent une surexpression ainsi qu'une abondance protéique augmentée lors des saisons migratoires dans le muscle (Weber, 2009; McFarlan et al., 2009). Ce phénomène permettrait ainsi aux oiseaux d'augmenter le captage des lipides. Tavernier et al., (2017) ont montré que FABP4 et VLDLR (récepteur aux VLDL) sont surexprimés après gavage dans le foie des canards mulards par rapport au canard Pekin et Barbarie. Cela suggère que la meilleure capacité de réponse au gavage du canard mulard et donc sa capacité d'accumulation des lipides dans le foie serait d'avantage le résultat du retour de lipides vers le foie qu'une lipogenèse exacerbée.

Le foie est donc l'un des organes les plus dynamiques chez les oiseaux. Il est responsable de la plupart des processus de synthèse, de métabolisme, d'excrétion et de détoxification dans le corps, en régulant la production, le stockage et la libération des glucides, des lipides et des protéines.

## **2.5. La stéatose hépatique**

La stéatose hépatique se définit comme une accumulation de lipides dans le foie. Chez les animaux sauvages, c'est une adaptation physiologique aux besoins énergétiques dans des situations bien particulières comme l'hibernation ou la migration, et cette capacité est utilisée pour la production de foie gras chez les palmipèdes. Chez les animaux domestiques, ainsi que chez l'Homme, la stéatose hépatique est au contraire une situation indésirable voire pathologique.

### **2.5.1. La stéatose chez l'homme**

Chez l'homme, la stéatose correspond à un état pathologique associé à un dysfonctionnement des fonctions hépatiques. Elle peut résulter d'une consommation excessive d'alcool, d'une substance toxique, d'un syndrome métabolique comme l'obésité ou la résistance à l'insuline. Le foie gras est défini comme une accumulation de lipides

dans les hépatocytes supérieure à 5% du poids de foie (Cobbina and Akhlaghi, 2017) on parle alors de stéatose. Les anomalies lipidiques dans le foie sont traditionnellement classées en 2 catégories : alcooliques et non alcooliques.

La stéatose hépatique non alcoolique NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) est la forme la plus répandue dans les pays occidentaux, et est connue pour être un précurseur de la stéatohépatite (NASH: Non-alcoholic steatohepatitis) qui peut évoluer en cirrhose, voire en cancer primaire du foie (Torres and Harrison, 2008). Elle est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Bernsmeier and Heim, 2011) qui comprend au moins 3 des facteurs suivants: l'obésité, le diabète de type II, l'hypertension, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie. Son apparition est fortement liée à la résistance à l'insuline (Marchesini et al., 1999; Seppälä-Lindroos et al., 2002), caractérisée par une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie, et serait la succession de deux phénomènes.

- Le premier serait une accumulation de TG dans les hépatocytes par l'entrée de lipides alimentaires ou suite à une activation de la lipogenèse *de novo* fortement liée à la résistance à l'insuline (Marchesini et al., 1999; Seppälä-Lindroos et al., 2002) caractérisée par une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie.
- Le second serait un stress oxydatif capable d'initier la peroxydation des lipides et de provoquer un dysfonctionnement mitochondrial *via* la production de radicaux hydroxyles (Day and James, 1998) conduisant à la NASH.

La NAFLD est définie par la présence de stéatose hépatique sans preuve de lésion des hépatocytes sous forme de ballonnement. En revanche la NASH qui est un stade plus avancé que la NAFLD est définie par la présence de stéatose hépatique, de ballonnement des hépatocytes et d'inflammation avec des lésions hépatocytaires avec ou sans fibrose (Ahmed, 2018). Dans une étude comparant des patients à fort et faible taux de lipides dans le foie, il a été démontré que l'expression des transporteurs d'AG (FABP et FAT/CD36) ainsi que le récepteur aux VLDL (VLDL R) étaient positivement corrélés au contenu lipidique du foie (Greco et al., 2008). Ces transporteurs (FABP et FAT/CD36) et récepteurs (VLDL R) d'AG semblent donc très importants dans le mécanisme de la stéatose hépatique.

### 2.5.2. La stéatose hépatique chez l'oiseau

Chez les oiseaux, l'état de stéatose hépatique n'est pas toujours pathologique et il peut même survenir spontanément, sans alimentation forcée, dans certaines situations. Ainsi, chez la poule en ponte par exemple, une forte activité lipogénique et une augmentation du poids de foie et de la teneur en lipides hépatiques sont observées avant l'ovulation, sous influence oestrogénique. Ces lipides sont ensuite sécrétés et utilisés pour la vitellogenèse (Sauveur, 1988).

La stéatose hépatique est aussi un moyen naturel de stocker beaucoup d'énergie en vue de longs vols chez les oiseaux migrateurs (Dolnik and Blyumental, 1967). C'est cette capacité naturelle qui est utilisée pour la production de foie gras induite par le gavage d'oies et de canards. Cette stéatose est intense puisque le poids de foie peut être multiplié par 10 en 15 jours chez l'oie (Hermier et al., 1999). La synthèse des AG, dépendant des précurseurs glucidiques, est fortement stimulée en période de gavage par la composition riche en amidon du maïs. En effet, la pâtée de gavage est un aliment très énergétique (3250 kcal/kg) et très riche en glucide (plus de 85%). Le foie gras est donc le résultat d'une forte activité hépatique de la lipogenèse *de novo* conduisant à l'accumulation de lipides (principalement TG) (Fernandez et al., 2011) menant à la stéatose (Hermier et al., 1991). Cependant, il existe une forte variabilité de la réponse au gavage dépendante du génotype utilisé. Tavernier et al., 2017 ont montré une baisse de l'expression des gènes liés à la formation des lipoprotéines chez les canards de Barbarie et mulard comparés au Pekin, plus spécifiquement l'Apolipoprotéine B (ApoB) et la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP), menant à une accumulation de lipides dans le foie. Chez les canards Pékin, l'expression de MTTP est augmentée suggérant une meilleure exportation des lipides hépatiques. Au contraire, la Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) et le Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR), impliqués dans le re-captage hépatique des lipides, apparaissent surexprimés dans le foie des canards mulard à la fin de la période de gavage. Ce phénomène met en lumière un mécanisme inconnu jusqu'à aujourd'hui, suggérant que le canard mulard peut réintégrer dans son foie plus de lipides que les deux autres génotypes conduisant ainsi à une stéatose hépatique plus intense.

### 2.5.3. Réversibilité

Même si d'importants changements sont observés, une multiplication du poids du foie pouvant aller jusqu'à 10 fois son poids de départ ainsi qu'une forte augmentation du

nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques de type macro-vacuolaire, de taille égale ou supérieure à 1/10 de la surface de la cellule, aucune lésion majeure n'est induite par le gavage au niveau histologique (Blum et al., 1990; Bénard and Labie, 1998).

La stéatose des palmipèdes induite par le gavage a été montrée comme réversible. Après une période de gavage suivie d'un arrêt du gavage et d'un placement des animaux dans un parc avec un libre accès à de l'aliment et de l'eau, les paramètres de captation et d'épuration du foie ont les mêmes valeurs que pour des animaux témoins non gavé (Babilé et al., 1996, 1998; Bénard et al., 1998; Locsmándi et al., 2005). De plus aucun dérèglement des activités métaboliques n'est observé (Hermier et al., 1998). Si le gavage des animaux est interrompu, le poids de foie diminue rapidement, traduisant l'exportation des lipides vers les tissus périphériques (Blum et al., 1990; Bénard and Labie, 1998). Deux semaines après la fin du gavage les caractéristiques histologiques du foie et les paramètres physiologiques retournent progressivement aux valeurs enregistrées avant gavage, pour y parvenir quatre semaines après l'arrêt du gavage (Babilé et al., 1996, 1998; Bénard et al., 1998; Locsmándi et al., 2005), cette expérience a été menée 3 fois de suite sur le même groupe d'animaux et les mêmes résultats ont été retrouvés après chaque cycle de gavage.

### **3. Régulation du métabolisme énergétique et réponses physiologiques au stress en lien avec le système endocrinien**

Les deux principaux systèmes de régulation d'un organisme sont le système nerveux et le système endocrinien. L'interface et la coordination de ces deux systèmes sont assurées en grande partie par l'hypothalamus.

#### **3.1. Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien**

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) ou axe corticotrope est un système neuroendocrinien de première importance dans la régulation du métabolisme énergétique et les réponses au stress (Figure 15). L'hypothalamus qui est impliqué dans la régulation hormonale produit l'hormone de libération de la corticotropine (CRH) et la vasopressine. La vasopressine et la CRH déclenchent la sécrétion par l'hypophyse de corticotropine (ACTH) qui stimule la sécrétion de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Les glucocorticoïdes majoritairement libérés dans le flux sanguin sont le cortisol chez la vache, le mouton, le cochon, le vison, le renard et le poisson et la **corticostérone** chez les oiseaux et les rongeurs. La corticostérone agit sur un grand nombre de cellules et tissus par

l'intermédiaire de deux récepteurs spécifiques. Le premier est le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) et le second est le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), et la liaison de l'hormone à chacun de ces récepteurs dépend de sa concentration circulante. Ainsi, la corticostérone se lie tout d'abord au récepteur à haute affinité MR, puis, quand les concentrations de l'hormone atteignent des valeurs importantes, comme c'est le cas lors de l'exposition à un stimulus stressant ou lors de la phase active du rythme circadien, la corticostérone se lie progressivement aux récepteurs GR (de Kloet et al., 2005). La réponse de l'axe corticotrope induit des réactions retardées à l'agent stressant de 2 à 30 minutes après le stimulus. Il exerce de nombreux effets sur les métabolismes (hyperglycémie par formation de glucose à partir d'éléments non lipidiques, réduction de la capture de glucose par un certain nombre de tissus biologiques), le système immunitaire, les processus inflammatoires (modération des réactions cellulaires à l'agression) et les fonctions cérébrales, pour citer les plus importants (Di et al., 2003; Karst et al., 2005; Ulrich-Lai and Herman, 2009). Ainsi les modifications physiologiques entraînées par l'activation de l'axe corticotrope préparent l'organisme à résister à la situation de stress (diminution de la croissance et de la reproduction, affaiblissement du système immunitaire).

L'activité de base de l'axe corticotrope et sa réponse au stress sont largement influencées par des facteurs génétiques. D'importantes variations fonctionnelles peuvent être observées entre types génétiques chez le Porc (Geverink et al., 2006; Foury et al., 2007), et des sélections divergentes ont été réalisées chez de nombreuses espèces sur la base de la réponse de l'axe corticotrope à diverses stimulations : truite (stress de confinement), poulet (réponse à l'ACTH, stress social), dinde (stress au froid), caille (stress d'immobilisation), canard (stress de suspension), souris (stress de contrainte)(Mormède et al., 2002). La variabilité génétique est présente dans toutes les composantes de l'axe : Dans le niveau de production des hormones glucocorticoïdes, régulé principalement par la sensibilité de la glande surrénale à l'ACTH. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont recherchés par études d'expression différentielle des gènes dans la glande surrénale en réponse à l'ACTH chez le poulet (Bureau et al., 2009). De nombreuses données expérimentales montrent que ces différentes sources de variabilité de l'axe corticotrope ont des conséquences fonctionnelles.

En conséquence de l'importance de l'axe corticortope dans la régulation du métabolisme énergétique et des réponses au stress, son niveau d'activité influence à la fois les caractères de production (de façon négative) et les caractères de robustesse (de façon positive) des animaux d'élevage.

Les glandes surrénales ont pour rôle de synthétiser et sécréter de nombreuses hormones dans la circulation sanguine. Les glucocorticoïdes mais aussi des **catécholamines** (l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine). L'activation de l'axe catécholaminergique est associée à une réaction immédiate à un agent stressant. Déclenchée par le système nerveux sympathique (SNS), elle aboutit à la libération de catécholamines via l'innervation sympathique au niveau des terminaisons nerveuses sur les organes cibles (noradrénaline) ou via le nerf splanchnique au niveau des médullosurrénales (adrénaline et noradrénaline). Leur libération rapide dans le flux sanguin présente un pic sécrétoire moins de 2 minutes après le stimulus. Ces catécholamines induisent la plupart des modifications des paramètres biologiques : tachycardie, augmentation de la pression artérielle, vasodilatation musculaire, vasoconstriction au niveau du système digestif, augmentation du calibre bronchique, hyperglycémie par glycogénolyse, hypertriglycéridémie par lipolyse, augmentation de la **thermogenèse** et pilo-érection.

L'adrénaline qui est une hormone de réponse au stress augmente le taux d'AMPc dans les cellules-cibles, ce qui entraîne une augmentation de la glycémie, l'activation de la glycogénolyse, de la gluconéogenèse (action antagoniste de celle de l'insuline) et l'inhibition de la glycogénogénèse. Elle inhibe également la sécrétion d'insuline, et augmente la sécrétion de glucagon (adrénaline). L'adrénaline influence également le métabolisme des lipides en stimulant la lipolyse (lipase hormono-sensible) et inhibant la lipogenèse.

L'effet global qui est essentiellement le fait des récepteurs Bêta est de stimuler la dégradation des substrats. Conséquence: une hyperglycémie, une hyperlactacidémie, une hyperlipidémie, une augmentation de la consommation d'oxygène (effet sympathomimétique avec accélération cardiaque).

Chez les poulets les catécholamines, au moins dans le foie, peuvent être des régulateurs physiologiques du métabolisme lipidique car pendant les périodes d'inactivité, il existe une relation positive entre les catécholamines circulantes et les acides gras libres. La synthèse

des acides gras (lipogénèse) par les tissus et cellules hépatiques est inhibée par l'épinephrine (adrénaline) et, dans une moindre mesure, par la norépinephrine (noradrénaline). Cet effet est médié par les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques et, au moins partiellement, par l'AMPc agissant comme messenger intracellulaire (Campbell and Scanes, 1985). La lipolyse dans les cellules graisseuses est stimulée par l'épinephrine chez plusieurs espèces d'oiseaux et semble être médiée par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et l'AMPc (Campbell and Scanes, 1985).

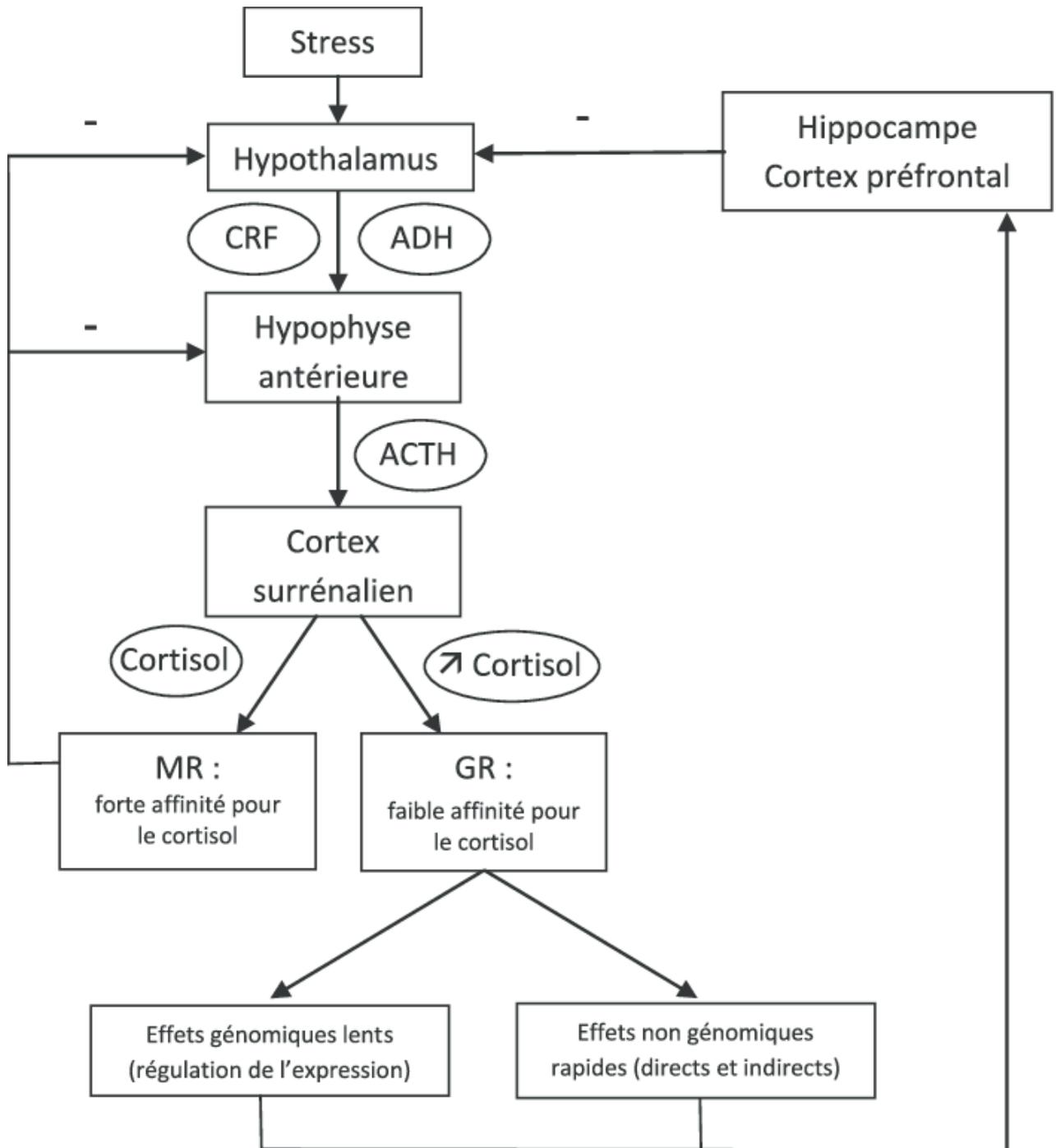


Figure 15: Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. ACTH : hormone corticotrope ; ADH : hormone antidiurétique ; CRF : corticotropin-releasing hormone ; GR : récepteurs aux glucocorticoïdes ; MR : récepteurs aux minéralocorticoïdes ; - : rétrocontrôle négatif. (Chaumette et al., 2016)

## **3.2. Axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien**

### **3.2.1. Production et sécrétion des hormones thyroïdiennes**

La production et la sécrétion des hormones thyroïdiennes sont contrôlées par un mécanisme complexe de régulation positive et négative par l'axe hypothalamo-hypophysaire (figure 16). La TRH (Hypothalamic TSH releasing hormones) stimule la sécrétion de TSH (thyroid stimulating hormon) depuis l'hypophyse antérieure. La TSH initie ensuite la synthèse et la libération de TH depuis la glande thyroïde. La synthèse des gènes de TRH et TSH est inhibée au niveau transcriptionnel par le niveau des hormones thyroïdiennes (Chiamolera and Wondisford, 2009).

Il existe 2 hormones produites par la thyroïde ; la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3). La T4, majoritaire, est considérée comme une pro-hormone pouvant être dégradée pour donner la T3, représentant la forme active. Cette conversion est faite par la iodothyronine 1 dans le foie et le rein ou par la deiodinase II dans le cerveau, l'hypophyse et le tissu adipeux brun (Jianhua et al., 2000).

### **3.2.2. Rôle des hormones thyroïdiennes chez l'embryon**

L'une des principales fonctions des hormones thyroïdiennes (TH), et probablement aussi la plus ancienne de l'évolution des vertébrés, est la coordination du développement embryonnaire et du développement postnatal précoce. En activant et désactivant l'expression d'une multitude de gènes, les TH s'assurent que le déroulement correct de prolifération, de différenciation et de maturation cellulaire soit suivie dans chaque organe / tissu en développement (Darras, 2019). De nombreux gènes clés du développement ne réagissent qu'à la signalisation des TH au cours de la fenêtre de développement spécifique. De ce fait, l'expression intempestive de ces gènes peut compromettre le développement et le fonctionnement d'organes importants de manière persistante et irréversible. Bien que les TH soient nécessaires dès le début du développement, la glande thyroïde embryonnaire ne mûrit que vers le milieu de l'incubation chez les espèces précoces telles que le poulet et la caille japonaise (Thommes, 1987). Les espèces précoces sont celles dans lesquelles les jeunes sont relativement matures et mobiles dès leur naissance ou leur éclosion. Les embryons de mammifères peuvent compter sur un apport continu de TH maternels via le placenta. Le développement externe chez les oiseaux exclus toutefois cette possibilité, qui s'appuie donc sur les TH maternelles

déposées dans le jaune d'œuf. L'extraction et le transport de ces hormones du jaune vers les tissus embryonnaires tout au long du développement se fait par l'expression précoce des régulateurs de TH, tels que les protéines distributrices des TH qui sont des protéines plasmatiques liant les TH et permettant leur distribution depuis leur site de synthèse vers leurs cellules cibles dans tout le corps (Rabah et al., 2019), les transporteurs des TH (Visser et al., 2011), les iodothyronine déiodinases ainsi que des récepteurs TH dans la membrane du sac vitellin. Tous ces éléments vont permettre l'extraction et le transport des TH dans les tissus embryonnaires où elles peuvent être activées afin de réguler la transcription des gènes du développement, tout au long de l'incubation (Darras, 2019).

### **3.2.3. Rôle des hormones thyroïdiennes chez l'adulte**

Ces hormones sont aussi essentielles pour la régulation du métabolisme énergétique cellulaire et tissulaire chez les adultes (Cheng et al., 2010). Au sein de la mitochondrie qui est le site majeur de la  $\beta$ -oxydation (Goglia et al., 1999), les hormones thyroïdiennes stimulent la consommation d'oxygène ainsi que l'hydrolyse de l'ATP et participent donc à la régulation du métabolisme de base ainsi qu'à la production de chaleur corporelle.

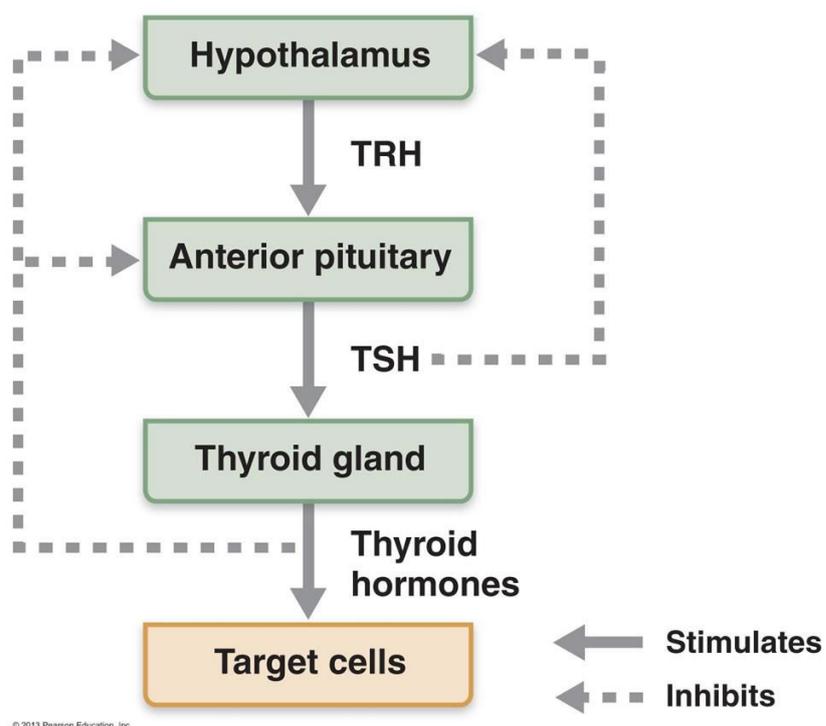


Figure 16: Régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes

Un excès d'hormone thyroïdienne (hyperthyroïdie) chez l'homme, favorise un état hyper métabolique caractérisé par une augmentation de la dépense énergétique au repos, une perte de poids, une réduction du taux de cholestérol, une lipolyse et une gluconéogenèse augmentée (Brent, 2008). Inversement, une réduction des taux d'hormones thyroïdiennes (hypothyroïdie), est associée à un hypo métabolisme caractérisé par une réduction de la dépense énergétique au repos, une prise de poids, une augmentation du taux de cholestérol, une réduction de la lipolyse et une réduction de la gluconéogenèse.

#### **3.2.4. Rôle des hormones thyroïdiennes dans le métabolisme lipidique**

La régulation du métabolisme lipidique par les hormones thyroïdiennes dépend principalement de l'action simultanée de T3, du récepteur des hormones thyroïdiennes de type  $\beta$  (TR $\beta$ ) et des récepteurs nucléaires d'hormone dans le foie.

L'activité métabolique du tissu adipeux est de plus en plus reconnu, et c'est un site significatif d'action des hormones thyroïdiennes (Rocha and Libby, 2008). Les TH régulent la synthèse de cholestérol grâce à de multiples mécanismes. La principale voie de régulation est la stimulation de la transcription des récepteurs aux LDL (LDL-R) par les TH qui induit une augmentation de l'absorption de cholestérol (Lopez et al., 2007). Les hormones thyroïdiennes induisent aussi l'expression du gène SREBP-2 (sterol response element binding protein) qui va à son tour moduler l'expression de LDL-R. SREBP-2 est un facteur de transcription qui intervient dans la régulation du métabolisme glucidique, la synthèse des acides gras et le métabolisme du cholestérol (Figure 17 et 18)(Madison, 2016). Les TH stimulent aussi à la fois la lipolyse et la lipogenèse. L'action directe des TH est la lipolyse mais la lipogenèse est stimulée pour restaurer et maintenir les réserves de graisses suite à la perte de graisse qui se produit lors de la lipolyse induite par la TH (Oppenheimer et al., 1991). De plus les TH jouent également un rôle important dans la conversion des préadipocytes en adipocytes (Obregon, 2008).

#### **3.2.5. Rôle des hormones thyroïdiennes dans la thermogénèse**

Les acides gras produits lors de la lipolyse induite par les TH sont le substrat de l'augmentation de la thermogénèse (Oppenheimer et al., 1991). L'oxydation des acides gras dans les mitochondries est couplée à la synthèse d'ATP, résultante du retour des

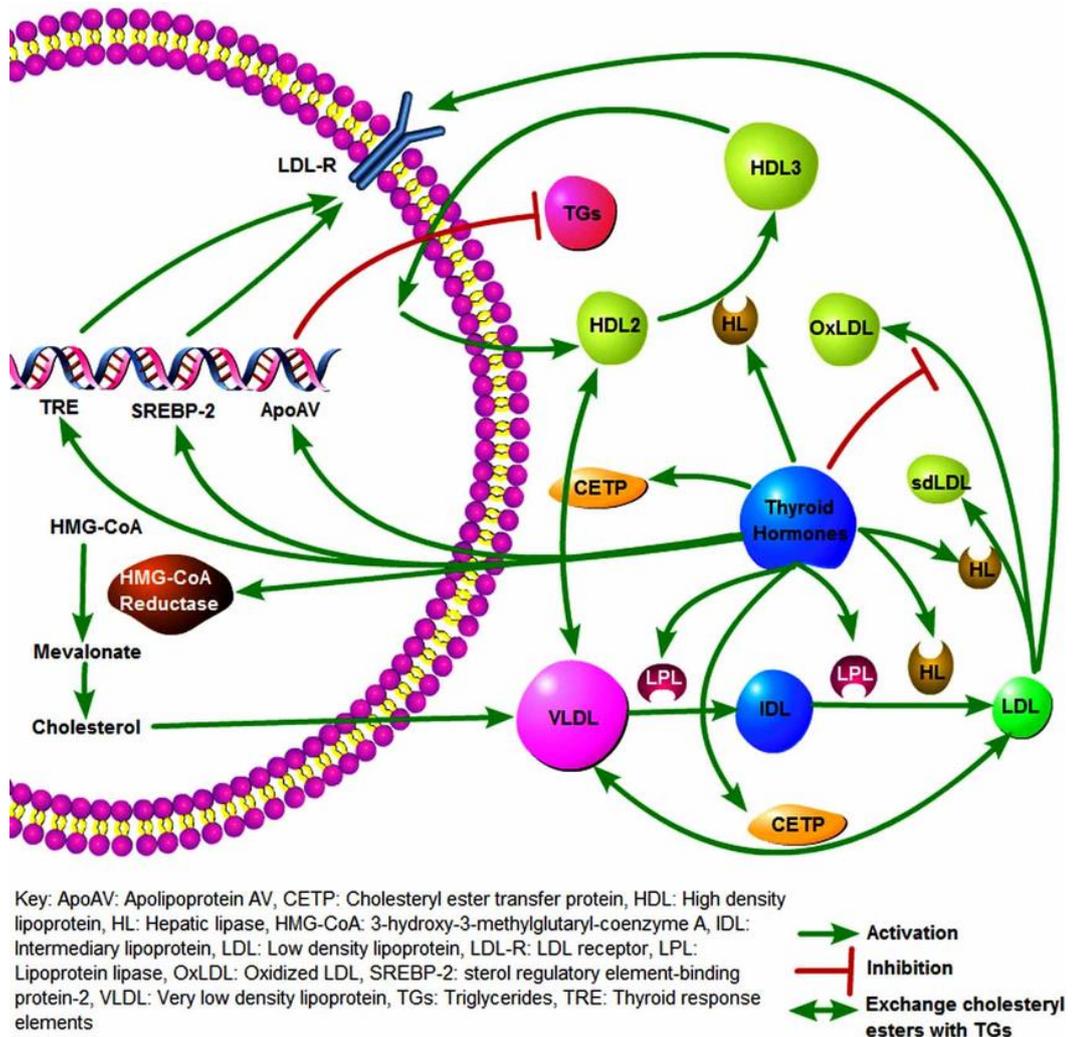


Figure 17: Effets des hormones thyroïdiennes sur le métabolisme lipidique. (Rizos et al., 2011)

protons accumulés au niveau de l'espace inter membranaire vers la matrice mitochondriale à travers l'ATP-synthase membranaire. Mais une partie de ces protons rejoint la matrice mitochondriale sans participer à la synthèse d'ATP. Dans ce cas l'énergie potentielle de ces protons n'est pas transformée en énergie chimique mais en chaleur (théorie de Mitchell) et l'on parle de découplage mitochondrial (Figure 19). Le mécanisme de découplage de la respiration permet aux mitochondries de dissiper la plus grande partie de l'énergie oxydative sous forme de chaleur au lieu de synthétiser de l'ATP. Chez les mammifères dans le tissu adipeux brun, cette capacité est due à la présence spécifique d'une protéine de la membrane interne mitochondriale appelée UCP1 (uncoupling protein 1). A la différence du tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun est très vascularisé et contient beaucoup de mitochondries ce qui indique une forte capacité d'oxydation des substrats, il est unique et essentiel dans la lutte contre le froid. L'invalidation du gène murin UCP1 a confirmé son rôle essentiel dans le maintien de la température corporelle lors de l'exposition au froid. Le gène UCP2 s'exprime dans la plupart des tissus et types cellulaires, alors que le gène UCP3 est exprimé principalement dans les muscles squelettiques. Le gène UCP 4 est exprimé dans le cerveau et le tissu neural. Chez les espèces aviaires l'expression des UCP a été montrée dans le muscle squelettique des poulets et des canards, il n'y a pas de tissu adipeux brun chez les oiseaux ni d'UCP1. Chez le poulet les tissus d'expression d'UCP sont similaires à l'UCP3 et l'UCP2 des mammifères avec une expression importante dans le muscle squelettique mais aussi détectés dans le cœur, le foie, le poumon et les reins (Evock-Clover et al., 2002). Selon l'étude de Duchamp and Barre (1993) chez le canard, le tissu musculaire intervient pour 71% dans la thermogénèse adaptative sans frisson et le foie dans 10 à 15% lors d'une exposition au froid. Chez l'oiseau, le muscle squelettique semble être le site privilégié de la thermogénèse sans frisson via une activation du métabolisme énergétique (Teulier et al., 2010).

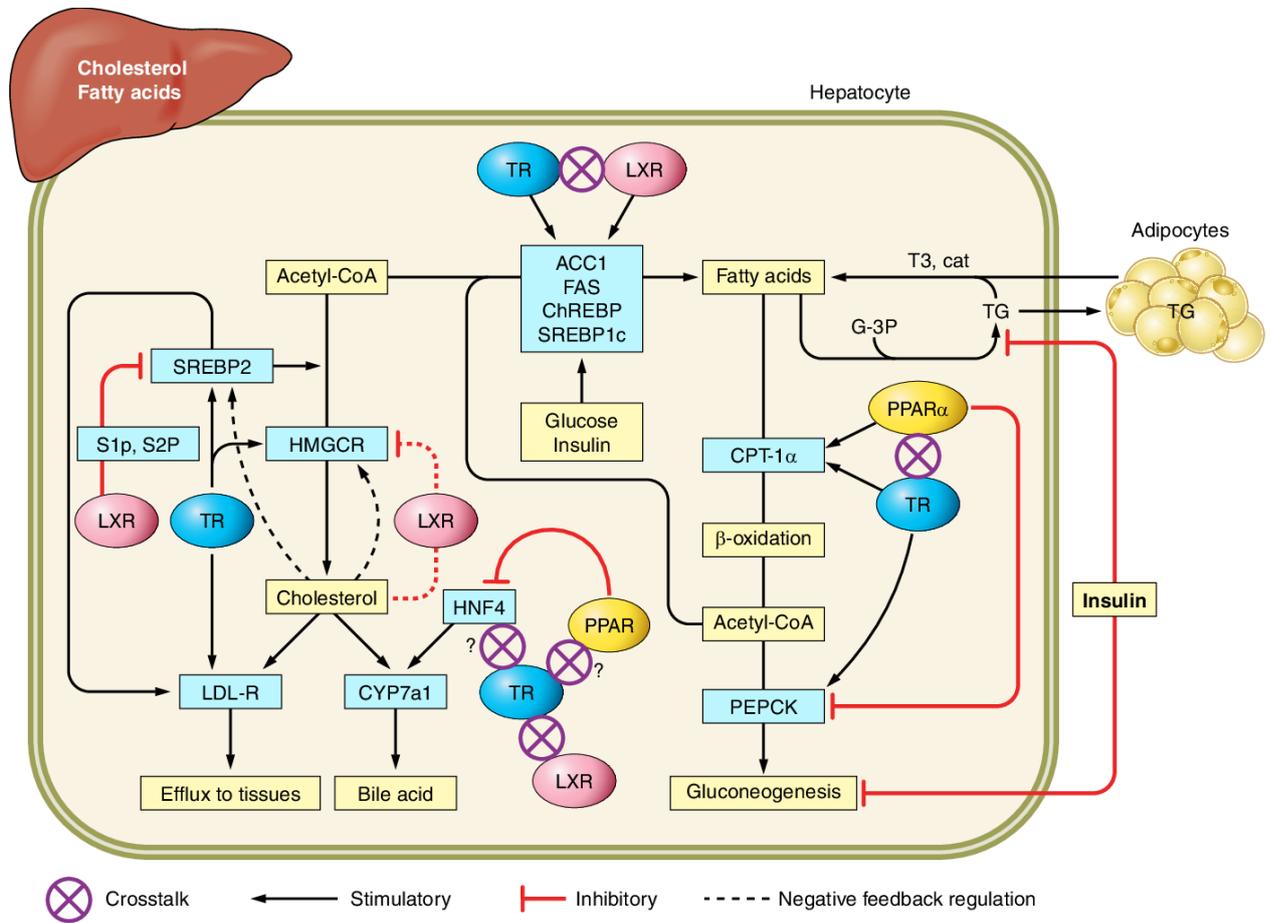
Les mammifères et les oiseaux sont donc des homéothermes capables de maintenir une température centrale constante pendant toute leur vie, même lors de variation de la température ambiante. La production de chaleur en réponse à la température ambiante ou au régime alimentaire est couramment appelée thermogénèse adaptative (thermogénèse de frisson ou sans frisson), et modifie de manière importante la dépense énergétique au repos. Les TH augmentent le taux métabolique et la thermogénèse sans frisson

uniquement chez les espèces homéothermiques (Silva, 2006). Pour réguler la température centrale la T3 peut agir de deux façons :

- en modulant directement la thermogenèse au niveau génique et modifiant le taux de transcription des UCP (uncoupling protein) par liaison à un récepteur nucléaire. Le complexe formé entre dans le noyau et participe à la régulation de l'expression génique des ARNm mitochondriaux.
- en agissant sur la membrane, induisant un effet facilitateur du métabolisme cellulaire par des actions directes sur les récepteurs adrénergiques, les pompes ioniques (sodium / potassium et la pompe à calcium) ou en facilitant le passage de substrat énergétiques tels que le glucose et les lipides dans le muscle squelettique (Silva, 2006).

Lorsque la température ambiante augmente, les animaux à sang chaud réagissent en diminuant le taux de sécrétion d'hormones thyroïdiennes et inversement (Silva, 2003). Une corrélation négative entre la concentration plasmatique de T3 et la température ambiante a également été rapportée chez les poulets (Brigmon et al., 1992; Tao et al., 2006). Cependant, il a été montré que des volailles sélectionnées pour la croissance réagissaient au stress thermique (chaud) en augmentant les niveaux d'hormones thyroïdiennes (T3 et T4) tandis que les animaux non sélectionnés en croissance ne présentaient aucun changement (Bowen et al., 1984; Bowen and Washburn, 1985). Ceci suggère que la sélection génétique en vue d'augmenter les performances de croissance peut modifier la réponse des hormones thyroïdiennes des oiseaux aux variations de température ambiante.

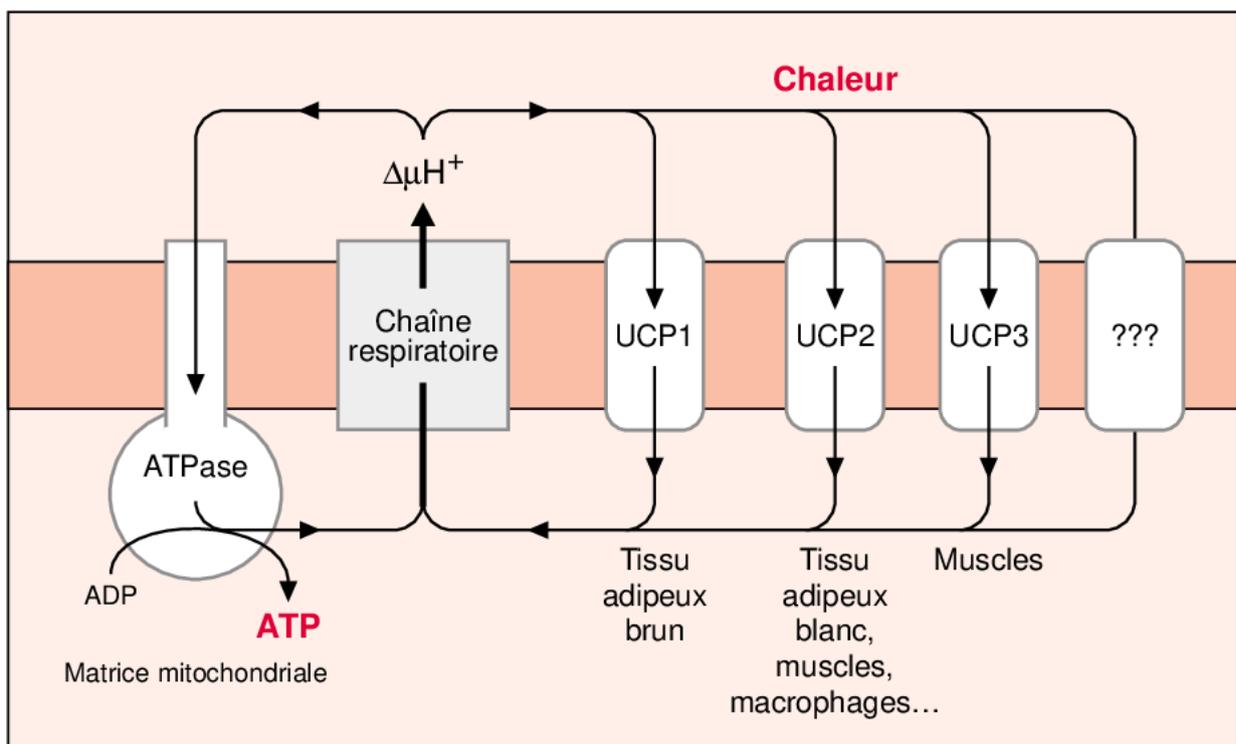
L'expression et l'activité de CPT-I (carnitine palmitoyl transférase 1) qui convertit les acyl-CoA à longue chaîne en acylcarnitine pour la translocation mitochondriale, sont considérablement accrues dans le foie des animaux hyperthyroïdiens (McGarry and Brown, 1997; Jackson-Hayes et al., 2003). Il a été montré que la T3 intervient également dans la dégradation de gouttelettes lipidiques par autophagie (Singh et al., 2009).



**Figure 18: Implication des hormones thyroïdiennes dans le métabolisme lipidique par l'action directe et indirecte de T3. La T3 stimule les TR = Thyroid receptor (D'après Mullur et al., 2014)**

Les fonctions biologiques des hormones thyroïdiennes chez les oiseaux sont similaires à celles observées chez les mammifères. Ces fonctions incluent le contrôle du métabolisme de base, le développement du système nerveux central, le développement *in utero* et postnatal des muscles et des os (Lumeij and Westerhof, 1988), ainsi que le contrôle de la fonction de reproduction (Kelly and Tindall,; Evans and Romanoff, 1960). Les canards thyroïdectomisés sont hypoglycémiques et ont une accumulation de glycogène dans le foie en raison d'une glycogénolyse diminuée. Les TH régulent donc aussi la glycogénolyse.

En conclusion les hormones thyroïdiennes sont indispensables à la bonne régulation de la température ainsi qu'au bon fonctionnement du métabolisme lipidique et glucidique et des fonctions de reproduction.



**Figure 19: Représentation schématique des diverses UCP au sein de la membrane interne des mitochondries chez les mammifères.** Dans toutes les mitochondries le retour des protons vers la matrice se fait via l'ATP synthase en catalysant la phosphorylation de l'ADP. Les diverses UCP constituent d'autres voies de retour des protons non couplées à un système catalysant la synthèse d'ATP. UCP1 est spécifique des adipocytes bruns, UCP2 est détectée dans de nombreux tissus, UCP3 est principalement présente dans les muscles squelettiques. Il est possible qu'il existe d'autres protéines ayant une activité de découplage de la respiration.

## 4. La programmation embryonnaire

### 4.1. Découverte et principe de la programmation

Les périodes embryonnaire et néonatale sont les étapes de la vie où la plupart des processus de développement se produisent et où les cellules, tissus, organes, systèmes métaboliques et hormonaux sont mis en place. L'organisme en développement est fragile et il a besoin d'importants apports pour se développer. En 1990, sous l'impulsion de Hales et Barker, naît le concept de programmation nutritionnelle, pour expliquer comment un environnement nutritionnel *in utero* inapproprié peut induire à long terme le développement de pathologies métaboliques (Hales et al., 1991; Barker, 1998). Cette notion de programmation nutritionnelle suggère qu'une modification de la nutrition pendant les phases critiques du développement de l'embryon ou juste après la naissance, perturbe le processus physiologique normal de développement des organes et leur fonctionnement métabolique. Ces modifications constituent une réponse adaptative vis-à-vis de « l'agression nutritionnelle » en assurant à court terme la survie de l'individu. La première étude épidémiologique est celle portant sur la grande famine qui a touché la population d'Amsterdam pendant la Seconde Guerre Mondiale (Roseboom et al., 2001; Lumey et al., 2007; Schulz, 2010). Le stress nutritionnel subi par les femmes enceintes a entraîné la naissance de bébés plus légers, et ce d'autant plus que les événements stressants avaient eu lieu en fin de grossesse. A l'âge adulte, la majorité d'entre eux souffraient d'intolérance au glucose associée à une résistance à l'insuline, et un IMC augmenté (Indice de Masse Corporelle qui est une norme internationale pour mesurer l'excès de poids et l'obésité, calculé en divisant le poids d'une personne par le carré de sa taille) ainsi qu'une augmentation du taux de maladies cardiovasculaires. Ces résultats ont montré pour la première fois que la dénutrition au cours de la grossesse pouvait avoir un impact sur le devenir métabolique de la personne et suggéraient l'existence de fenêtres de programmation correspondant aux stades critiques du développement. A long terme, ces modifications adaptatives créaient les conditions d'apparition de pathologies métaboliques si l'organisme se trouvait exposé à un environnement fondamentalement différent comme une nutrition en excès pour les personnes ayant été soumises à une malnutrition maternelle. Initialement, la théorie de Barker dite également théorie du « phénotype économe » a été fondée sur les études ayant traité la dénutrition maternelle, mais cette notion est maintenant élargie et s'applique également aux cas de malnutrition et/ou dysnutrition

maternelle parmi lesquelles la surnutrition. Ces modifications du régime alimentaire maternel sont également associées à l'apparition de troubles métaboliques chez la descendance à l'âge adulte comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, le syndrome métabolique, des modifications du métabolisme du cholestérol, de la réponse de l'insuline au glucose (Haugaard et al.,; Barker et al., 1993; Vickers et al., 2000; Jimenez-Chillaron et al., 2006; Desai et al., 2007b; a; Lukaszewski et al., 2011; Tarry-Adkins and Ozanne, 2011; Howie et al., 2012; Kwon and Kim, 2017).

#### 4.2. Les mécanismes de la programmation

Pour comprendre les mécanismes sous-jacents qui rentrent en jeu dans ces phénomènes, des modèles animaux ont été établis. Ces modèles animaux ont permis de vérifier le lien identifié chez l'Homme entre la nutrition précoce et les pathologies observées à plus ou moins long terme. Mais ils ont également permis de comprendre certains mécanismes physiologiques et moléculaires engagés dans cette programmation nutritionnelle. Ces mécanismes comprennent des **modifications structurelles** permanentes d'organes résultant d'une baisse de concentrations d'un facteur important au cours d'une période critique de développement. Par exemple, il est connu que le pancréas dans sa partie endocrine est particulièrement sensible aux modifications de la nutrition pendant la vie fœtale, qui altèrent de manière permanente la structure de ce tissu (Holemans et al., 2003). De nombreux modèles animaux, comme les modèles de restriction protéinique maternelle chez le rat ont montré une réduction de la masse des cellules  $\beta$  (cellules à insuline) et de la vascularisation des îlots de Langerhans (Snoeck et al., 1990).

Un autre mécanisme implique des **modifications épigénétiques** qui vont moduler l'expression des gènes par un remodelage de la chromatine grâce à une méthylation de l'ADN associé à des modifications des histones. La modification de l'expression de facteurs de transcription peut affecter un large éventail d'autres gènes cibles en aval et intervenir dans le façonnage des tissus et des organes (Park et al., 2008). Les déiodinases 2 et 3 (dio2 et dio3) sont responsables de l'activation et de l'inactivation des hormones thyroïdienne T4 et T3, ce sont des cibles connues de la régulation épigénétique. Il a été montré qu'au cours de la différenciation des cellules musculaires, l'expression du gène dio2 est régulée positivement par la déméthylation et l'acétylation de l'histone, ce qui conduit à la différenciation des myoblastes (Ambrosio et al., 2013), tandis que dio3 est étroitement régulée par les mécanismes épigénétiques et est essentielle à la croissance

et à la viabilité de l'embryon chez différentes espèces (Charalambous and Hernandez, 2013). Certains chercheurs ont pensé à utiliser l'épigénétique dans le domaine de la nutrition pour améliorer la production animale. L'épigénétique nutritionnelle implique l'étude des mécanismes épigénétiques liés aux interactions gène-régime (Park et al., 2012). Même si l'utilisation efficace de l'épigénétique nutritionnelle appliquée à l'élevage en est à ses débuts, une base de recherche sur l'épigénétique nutritionnelle a été établie et a validé la relation directe entre les nutriments, notamment les vitamines, les macronutriments et les composés phytochimiques, et les modifications épigénétiques (Murdoch et al., 2016).

La programmation peut aussi avoir des effets permanents sur la régulation du vieillissement cellulaire comme par exemple, une augmentation du stress oxydatif qui entraîne des **dommages macromoléculaires**, y compris ceux causés à l'ADN et plus particulièrement aux télomères qui sont connus pour être raccourcis en présence de stress oxydatif (von Zglinicki, 2002; Tarry-Adkins et al., 2009).

Une meilleure compréhension de ces processus permettra d'élaborer des stratégies de prévention et d'intervention pour lutter contre les maladies courantes telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires.

La programmation pendant une période critique peut donc entraîner des adaptations au cours du développement pouvant modifier la structure, la physiologie ou le métabolisme des animaux après la naissance et certaines de ces modifications peuvent contribuer à améliorer leurs performances globales.

### **4.3. La programmation chez les oiseaux**

La programmation est désormais reconnue comme l'exposition à une large gamme de stimuli environnementaux au cours d'une phase critique du développement pouvant moduler le phénotype d'un individu à court ou long terme.

#### **4.3.1. Programmation nutritionnelle chez les oiseaux**

La possibilité d'améliorer les paramètres de production des poulets de chair au moyen de la manipulation des aliments des parents fait l'objet de recherches depuis de nombreuses années, dans le but de trouver des moyens d'influencer de manière la plus économique possible la croissance de leur progéniture. Chez la volaille, l'environnement nutritionnel de l'embryon en développement peut être modifié par le biais du régime alimentaire de la

mère, qui influe sur l'apport en nutriments dans l'œuf, ce qui peut avoir une incidence sur la condition physique du nouveau-né et, plus tard, sur le phénotype de l'adulte (Calini and Sirri, 2007; Van der Waaij et al., 2011; Bodin et al., 2019). Van der Waaij et al., (2011) ont montré que les descendants de mères soumises à une restriction alimentaire ont un poids corporel et une quantité de graisse abdominale à l'âge de 6 semaines supérieure aux descendants de mère nourries *ad libitum*. Ces résultats suggèrent un mécanisme commun chez les mammifères et les oiseaux en réponse à une inadéquation dans l'environnement nutritionnel mère-enfant.

La technologie en plein essor est l'injection *in ovo* de médicaments et de nutriments: cela permettra sans aucun doute de pouvoir influencer beaucoup plus facilement sur les performances des poulets de chair que dans le passé en donnant un véritable outil pratique aux producteurs de volaille. Cette méthode, qui consiste à injecter des solutions nutritives dans le liquide amniotique embryonnaire, a été créée pour la volaille et a été brevetée (Uni, 2014). La méthode utilise le fait que les embryons d'oiseaux consomment naturellement les liquides amniotiques avant l'éclosion. Par conséquent, l'ajout d'une solution nutritive dans le liquide amniotique embryonnaire fournit des nutriments essentiels à l'intestin des embryons comme des glucides qui peuvent être utilisés comme source de glucose, ce qui est crucial pour le processus d'éclosion et le développement des nouveau-nés (Moran, 1985). Les résultats de Uni et al. (2005) ont montré que l'injection in-ovo de glucides au 17<sup>ème</sup> jour d'incubation chez le poulet accroît les réserves en glycogène hépatique de 2 à 5 fois par rapport au contrôle, augmente le poids à l'éclosion de 5% à 6% et augmente de 6% à 8% la taille du muscle pectoral par rapport au poids corporel, tous ces avantages de poids ayant été observés jusqu'à la fin de l'expérience 25 jours post éclosion. Ceci pourrait amener à améliorer les performances des poulets de chair beaucoup plus facilement que par le passé, donnant un véritable outil pratique aux producteurs de volaille à grande échelle. La logique derrière la programmation nutritionnelle est que les perturbations nutritionnelles (c'est-à-dire, variation dans la qualité ou la quantité d'éléments nutritifs) pendant les périodes critiques au début de la vie peuvent avoir des effets à long terme sur les états physiologiques ou morphologiques.

#### **4.3.2. Programmation lumineuse chez les oiseaux**

Chez les oiseaux, la lumière est également un facteur pouvant influencer sur le développement embryonnaire et l'organisme post éclosion (Huth and Archer, 2015; Liu et al., 2017). Dans

l'industrie, les œufs de poulets de chair sont souvent incubés dans le noir. Dans des conditions naturelles en revanche les embryons d'oiseaux reçoivent des stimulations lumineuses pendant leur développement lorsque la mère part s'alimenter. De nombreuses études ont été faites pour améliorer les performances des oiseaux en manipulant l'éclairage. En effet, l'exposition des œufs d'oiseau (p.ex., poulets de chair, poulets White Leghorn, dindes et cailles) à la lumière blanche ou verte accélère le processus d'éclosion et les animaux sont plus lourds à l'éclosion que ceux conservés dans l'obscurité (Shutze et al., 1962; Siegel et al., 1969; Cooper, 1972; Walter and Voitle, 1972, 1973; Coleman and McNabb, 1975; Shafey and Al-mohsen, 2002). Une exposition des œufs à la lumière verte du 5<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour d'incubation augmente la croissance embryonnaire et l'éclosabilité de 4,8% (Shafey and Al-mohsen, 2002). Un traitement avec une lumière LED à 670nm (rouge) diminue la mortalité embryonnaire de 41,5% par rapport à des œufs de poulet contrôle sans lumière. A l'éclosion une augmentation du poids corporel et du poids du foie a aussi été observée (Yeager et al., 2005). Une lumière verte continue pendant les 18 premiers jours d'incubation accélère les temps d'éclosion d'environ 24 h.

Cependant, les effets positifs sur le développement embryonnaire et l'éclosion observés dans ces études pourraient être dus à un effet de surchauffe, en plus de l'effet d'éclairage (Romanoff, 1960), du fait que les œufs ont été incubés sous éclairage continu. Il est bien établi qu'une légère augmentation de la température d'incubation, qui augmente la température centrale de l'œuf accélère le développement embryonnaire, alors qu'une augmentation élevée de la température entraîne des anomalies des embryons et une mortalité plus élevée (Evans and Romanoff, 1960). C'est dans ce sens que Rozenboim et al., (2004) ont fait leur étude, et ont constaté que la photostimulation *in ovo* avec de la lumière verte monochromatique et un éclairage intermittent (15 min allumé et 15 min éteint) qui élimine l'effet de chaleur accélère le développement embryonnaire et augmente le poids corporel après éclosion ainsi que la croissance musculaire chez les poulets de chair. Le poids corporel plus élevé des embryons stimulés par la lumière verte, comparé à celui des embryons laissés à l'obscurité, était évident après 2 semaines d'incubation et demeurait jusqu'à 42 jours après l'éclosion, chez les poussins mâles et femelles. Le développement accéléré des embryons et la croissance accrue après l'éclosion observés dans cette étude sont uniquement dus à la photostimulation à la lumière verte et non à l'augmentation de température.

Un des éléments pouvant affecter la croissance et le développement embryonnaire est le rythme jour-nuit qui est médié par de fortes concentrations en mélatonine (hormone du sommeil) la nuit et une baisse le jour, ce sont des caractéristiques universelles des organismes vivants (Schultz, 2003). Le rythme circadien chez les oiseaux est établi dès le début du développement embryonnaire (Nichelmann et al., 1999; Zeman et al., 1999). Les cellules cérébrales qui libèrent la mélatonine, se sont révélées très sensibles à la lumière et ont montré une activité cyclique (Faluhelyi and Csernus, 2007).

Dans des conditions d'obscurité pendant l'incubation comme celles retrouvées dans les couvoirs industriels aucun rythme jour/nuit ne peut se développer à cause du manque de signaux lumineux stimulant l'embryon (Faluhelyi and Csernus, 2007). L'établissement du rythme circadien embryonnaire peut avoir un impact sur le fonctionnement de l'horloge biologique des poussins avant et après l'éclosion. Le rythme circadien est établi dans l'embryon et il détermine le moment d'éclosion et le rythme jour-nuit des nouveau-nés jusqu'à au moins 3 jours après l'éclosion (Zeman and Gwinner, 1993; Zeman et al., 1999). Le rythme des niveaux de mélatonine, qui est établi dans l'embryon, peut également affecter la rythmicité comportementale (Archer et al., 2009). Il a été démontré que la mélatonine agissait comme un agent anti-stress, pouvant réduire les concentrations plasmatiques de corticostérone induites par le stress. La mélatonine est capable de moduler le stress aux niveaux central et périphérique en exerçant son rôle inhibiteur de l'axe hypothalamo – hypophyso – surrénalien (HPA) chez les poussins et en supprimant la production de corticostérone (Saito et al., 2004).

Des hausses de T3 et de corticostérone plasmatiques ont été observées chez les embryons de poulet stimulés par la lumière (Tong et al., 2018). Ceci suggère que les concentrations d'hormones thyroïdiennes (T3 et T4) sont affectées par les rythmes circadiens de la mélatonine via la photopériode. Comme vu précédemment, ces hormones sont importantes pour stimuler divers processus de développement et métaboliques nécessaires à l'éclosion (Carsia et al., 1988). Il a aussi été montré que des périodes lumineuses régulent l'expression du gène *dio3* en agissant sur la méthylation chez le hamster. *Dio3* est essentielle à la croissance et à la viabilité d'un embryon (Charalambous and Hernandez, 2013; Stevenson and Prendergast, 2013).

#### **4.3.3. Programmation thermique chez les oiseaux**

La température a une profonde influence sur les fonctions biologiques des organismes ectothermiques. Chez les oiseaux, c'est un des facteurs les plus importants pendant l'incubation, elle stimule la croissance et le développement embryonnaire (French, 1994; Christensen et al., 1999). Des études ont été faites dans le but de comprendre les impacts écologiques potentiels du changement climatique mondial sur différents organismes (Pörtner and Farrell, 2008; Somero, 2010) mais aussi économiques dans le but d'améliorer la thermotolérance des poulets de chair et donc leurs performances.

La sensibilité de l'embryon à la chaleur varie considérablement au cours du développement, en fonction de la sensibilité des processus en cours. Maatjens et al., (2016) ont testé 4 températures d'incubation différentes chez le poulet (35,6°C, 36,7°C, 37,8°C ou 38,9 °C) à partir de E15, E17 ou E19 avec une même température de départ fixée à 37,8°C. Ces changements de température ont amené à une augmentation du poids de foie et du cœur à l'éclosion pour les animaux ayant subi une baisse de température. De manière générale, les résultats indiquent que les différents organes réagissent différemment aux traitements appliqués et selon la durée des traitements. La réponse des organes aux différents traitements au cours de la dernière semaine d'incubation peut être due aux différentes phases de l'organogenèse ainsi qu'au niveau de sensibilité des organes aux différents facteurs externes (Maatjens et al., 2016). Chez l'oiseau, la température est considérée comme l'un des facteurs les plus influents sur le développement embryonnaire, l'éclosion et la croissance post-embryonnaire (DuRant et al., 2011; Yahav and Brake, 2014; Li et al., 2017b). Les modifications de température au cours du développement embryonnaire peuvent donc être bénéfiques ou néfastes au développement de l'embryon. La programmation thermique peut améliorer la thermorégulation des animaux ainsi que les performances zootechniques (amélioration du taux de conversion alimentaire, du métabolisme, de la réponse immunitaire ainsi que du stress) (DuRant et al., 2012; Horowitz, 2014; Nassar et al., 2015).

#### **4.3.3.1. Impact sur l'éclosabilité**

L'incubation est définie comme le processus d'application de chaleur aux œufs et le contrôle de ce processus est essentiel au succès de l'éclosion. La plupart des oiseaux appliquent de la chaleur à leurs œufs en les couvant. La température optimale d'incubation des œufs de volailles sauvages semble se situer dans une large gamme allant de 33°C à 39°C, alors que pour les volailles domestiques, la gamme de température optimale se situe

entre 37 et 38°C et des écarts par rapport à cet optimum peuvent avoir un impact majeur sur le succès de l'éclosion (Visschedijk, 1991).

Des travaux expérimentaux ont montré que des modifications de températures d'incubation par rapport aux températures optimales impactent l'éclosabilité. Cet impact peut être négatif mais certaines études ont aussi montré un impact positif avec une augmentation d'éclosabilité, selon la variation de température, la période et la durée du traitement (Piestun et al., 2008b; Loyau et al., 2013; Nariç et al., 2016; Al-Rukibat et al., 2017).

Une augmentation de +1,7°C (24h/24h) par rapport à la température optimale lors de la 2eme moitié de l'embryogenèse (entre E7 et E16) avec une humidité relative (HR) augmentée de 56% à 65% a montré une baisse d'éclosabilité, passant de 83,3% à 50,6% chez le poulet (Piestun et al., 2008b). D'autre part, d'autres études chez le canard et le poulet ont montré qu'une manipulation thermique (MT) embryonnaire pouvait avoir un effet positif entraînant une augmentation d'éclosabilité (Collin et al., 2005; DuRant et al., 2013a; Al-Zhgoul et al., 2013; Al-Rukibat et al., 2017). Al-Zhgoul et al., 2013 ont par exemple montré qu'une augmentation de +1°C (18h/24h) avec une HR augmentée de 56% à 65% entre E10 et E18 chez le poulet entraînait une augmentation significative d'éclosabilité passant de 92,4% à 94,4%.

Toutes ces études tendent à montrer que la température d'incubation peut avoir un impact sur le taux d'éclosion, mais les résultats actuels ne permettent pas de conclure fermement sur un avantage ou un désavantage. D'autres expériences permettant de moduler tous les facteurs thermiques (durée, période, degré...) et hygrométriques pourront certainement éclairer la compréhension de ces mécanismes.

#### **4.3.3.2. Impact sur la thermorégulation**

Selon les perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO pour 2028, la viande de volaille sera le principal moteur de croissance de la production de viande et restera donc le plus grand secteur de viande au monde (OCDE, 2019). Au cours des dernières décennies, le poids corporel chez les poulets de chair a considérablement augmenté (Zuidhof et al., 2014). Dans les années 1960, le poids du marché d'un poulet de chair commercial était de 2,2 kg à l'âge de 12 semaines, de nos jours les poulets de chair atteignent ce même poids de marché en moins de 6 semaines (Berri et al., 2001; Zuidhof et al., 2014). Cette

amélioration impressionnante de la productivité résulte de la sélection génétique, de la nutrition et de l'amélioration dans la gestion d'ambiance. Cela a conduit à un développement rapide des performances des lignées commerciales de volaille. Les poulets de chair en particulier se caractérisent par une croissance et un taux métabolique élevés dès le développement embryonnaire (Janke et al., 2004; Druyan, 2010; Buzala et al., 2015). Tout cela a permis de réduire considérablement le temps nécessaire pour atteindre le poids du marché chez les poulets de chair (Zuidhof et al., 2014). Ces améliorations des performances de croissance ont malheureusement été effectuées au détriment des capacités cardiovasculaire et respiratoire des oiseaux, et cette croissance rapide est accompagnée d'une augmentation de la production de chaleur métabolique qui entraîne une sensibilité accrue aux stress thermiques, provoqués par des températures et une humidité élevées (Renaudeau et al., 2012; Terim Kapakin et al., 2013; Loyau et al., 2015).

Cette sensibilité accrue aux stress thermiques est un réel problème pour le bien-être des animaux. L'amélioration de la robustesse ainsi que de l'efficacité de la production est un des axes de recherche important de la filière volaille. Des études récentes utilisant une manipulation thermique embryonnaire au cours de périodes critiques ont montré des effets positifs sur la robustesse, la santé et les performances chez les poulets ainsi que chez les canards.

Beaucoup d'études ont été faites chez la volaille car la production en régions chaudes (Nord du Brésil, Asie, Afrique du Nord...) a augmenté ces 2 dernières décennies, les génotypes de poulets de chair utilisés y sont souvent les mêmes qu'en Europe et aux Etats-Unis. Dans ces régions, l'exposition à une chaleur modérée et chronique se traduit par des baisses de performances : les oiseaux tendent à diminuer leur production de chaleur en réduisant leur consommation d'aliment, ce qui allonge notamment la durée d'élevage (Tesseraud and Temim, 1999).

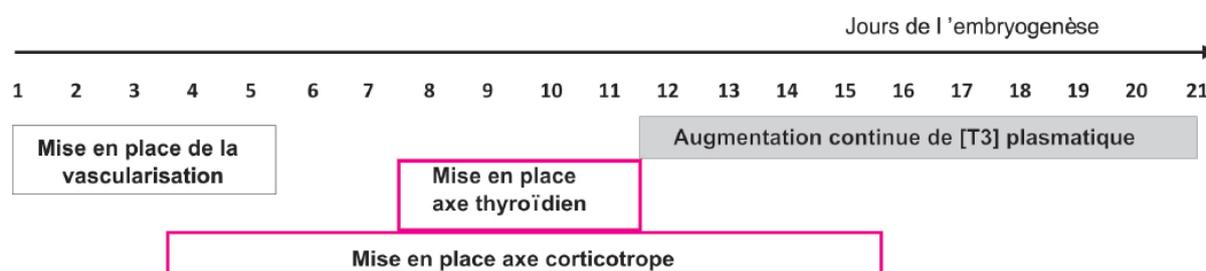
Les oiseaux ont une température interne stable malgré les variations de la température ambiante : ce sont des homéothermes. Ils assurent le maintien de leur température interne, grâce à la chaleur métabolique produite par leurs tissus (ce sont des endothermes) et à l'ajustement continu des transferts de chaleur entre le corps et l'environnement (Larbier and Leclercq, 1992). Les oiseaux sont capables de réguler la température de leur corps

sur une plage de température limitée (zone d'homéothermie) (ARJONA et al., 1988). En dessous de cette zone se déclenche la lutte contre le froid, et au-delà, la lutte contre le chaud. Une augmentation de la température corporelle au-dessus de la plage régulée peut déclencher une cascade irréversible d'événements potentiellement mortels comme des lésions tissulaires aiguës et une défaillance multiorganique souvent fatale. Les cellules cardiaques du poulet par exemple subissent une nécrose après 5 heures de stress thermique *in vivo* (40°C) et *in vitro* (Wu et al., 2015; Xu et al., 2017) médié en partie par une induction du stress oxydatif (Lin et al., 2006a; Tamzil et al., 2013). Dans un contexte de changement climatique, les pays européens sont de plus en plus soumis aux vagues de chaleur qui provoquent, en plus des baisses de performances une mortalité importante au coût économique élevé (44,5 millions d'euros en France ; (Amand et al., 2004)). Ces vagues de chaleur qui ne sont donc pas uniquement présentes en régions chaudes posent des problèmes en termes de bien-être des animaux, principalement en fin d'élevage quand les volailles sont les plus sensibles à la chaleur (Geraert et al., 1996). L'exposition à la chaleur aiguë provoque ainsi une modification de la réponse immunitaire (Altan et al., 2000), une hausse de la corticostéronémie (Yahav et al., 2004b), une alcalose respiratoire liée à l'hyperventilation respiratoire (Arad and Marder, 1983), un stress oxydant accru (Mujahid et al., 2005) et représente un stress pour l'animal (Debut et al., 2005). Au Venezuela, Lozano et al., (2006) attribuent 10% des mortalités en finition à des coups de chaleur survenus pendant les deux dernières semaines de vie chez le poulet.

Afin d'améliorer la thermotolérance des oiseaux et ainsi réduire les pertes économiques associées au stress thermique, différentes stratégies ont été suggérées. La génétique (croisement avec des poulets sélectionnés pour un génotype thermotolérant), la mise à jeun partielle, l'acclimatation des poussins, peuvent être mises en œuvre pour améliorer la tolérance des oiseaux à des variations de conditions thermiques (Lin et al., 2006b).

Enfin, la période embryonnaire (21 jours) représentant maintenant près de la moitié de la durée de vie après l'éclosion du poulet, il semble important de mener des recherches pendant la phase d'incubation. Tout ce qui entrave ou favorise le développement au cours de cette période aura un effet marqué sur les performances, la résistance et la santé de la volaille. Afin d'améliorer la tolérance à la chaleur des poulets de chair sans nuire à leurs performances de croissance, la programmation thermique embryonnaire s'est avérée des plus intéressantes.

La programmation thermique embryonnaire repose sur l'idée qu'une exposition à un stimulus thermique pendant le développement de l'axe physiologique permettant de commander la thermorégulation permettrait d'« adapter » la réponse de l'animal à un futur stress thermique. Pour que l'acclimatation embryonnaire soit efficace, l'exposition à la chaleur doit concorder avec le moment où les mécanismes qui commandent la thermorégulation sont activés (figure 20). Ces derniers sont régulés par les axes hypothalamo-hypophyso-thyroïdien et hypothalamohypophyso-surrénalien (Yahav and Hurwitz, 1996; Yahav, 1999; Yahav and McMurtry, 2001). Certains auteurs ont testé des augmentations de la température d'incubation pendant la phase de mise en place de l'axe corticotrope avant le 10<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E10) (Yahav et al., 2004a; Collin et al., 2007; Piestun et al., 2008b). D'autres auteurs ont choisi la période après E13 (Moraes et al., 2003; Yahav et al., 2004a; Collin et al., 2005), précédant la phase de production significative d'hormones thyroïdiennes. Ces études ont le plus souvent donné des résultats intéressants à court terme sur la température interne des poulets à croissance rapide, mais qui disparaissent en finition (Collin et al., 2007). Une augmentation discontinue de la température permet généralement d'éviter une baisse d'éclosabilité. Entre les jours E16 et E18 de l'embryogenèse la hausse de température d'incubation permet de réduire la thermogénèse des embryons par rapport aux embryons témoins parallèlement à une baisse de T3 (Tona et al., 2007). Une augmentation de la température d'incubation des poulets de chair de +1.7°C, 3h par jour de E16 à E18 améliore la thermotolérance et diminue le taux de corticostérone chez les poulets exposés à un pic de chaleur à l'âge de 3 jours (Yahav et al., 2004a). Les résultats de Piestun et al., (2008, 2009) et (Zaboli et al., 2017) indiquent qu'une augmentation de +1,7°C par rapport au contrôle avec une humidité relative qui passe de 56% à 65% sur la période allant de E7 à E16, qui englobe l'ensemble de la mise en place des axes de régulation thyroïdien et corticotrope, permet d'abaisser durablement la température interne et d'améliorer la tolérance à la chaleur avec une diminution de 50% de la mortalité lors d'une exposition à un pic de chaleur (35°C) au 34<sup>ème</sup> jour d'élevage chez le poulet de chair.



**Figure 20: Mise en place des mécanismes thermorégulateurs au cours de l'embryogenèse du poulet (D'après collin et al 2011)**

Différentes programmations thermiques ont été testées à différents stades du développement embryonnaire. Globalement, il a été montré que les poulets s'adaptent mieux au stress thermique pendant l'élevage après une **programmation thermique appliquée lors de la maturation des mécanismes thermorégulateurs et de la mise en place des axes hypothalamus-hypophyse-thyroïde et surrénalien** (Decuypere and Bruggeman, 2007; Piestun et al., 2008b, 2009; Renaudeau et al., 2012).

Cette technique induit des changements physiologiques et métaboliques rapides qui perdurent tout au long de la vie de l'animal. En revanche une augmentation continue et trop élevée (+3°C) entre E16 et E18.5 entraîne une réduction de la croissance embryonnaire ainsi qu'un retard dans le processus d'éclosion et une mortalité embryonnaire accrue parallèlement à une réduction du taux d'hormones thyroïdiennes (Willemsen et al., 2010). Une baisse de température de 3°C a aussi été testée, le processus d'éclosion est considérablement retardé mais un développement et une croissance embryonnaires similaires à ceux du groupe témoin sont observés, ce qui confirme que les embryons de poulet de chair sont plus sensibles aux températures élevées d'incubation qu'aux températures basses (Willemsen et al., 2010). Il a été démontré qu'une augmentation ou une diminution modérée de la température d'incubation des poulets améliorent leur capacité d'adaptation aux environnements chauds et froids respectivement, plus tard dans la vie (Yahav et al., 2004a; Shinder et al., 2011; Loyau et al., 2015, 2016; Al-Zghoul et al., 2015c; b; Piestun et al., 2015). Par conséquent, une **manipulation thermique embryonnaire maîtrisée permet d'améliorer la thermotolérance du poulet** de chair et peut réduire la mortalité lors d'une exposition à la chaleur aigüe (Piestun et al., 2008b).

#### 4.3.3.3. Impact sur la production de viande

Une augmentation de +1°C pendant les premiers stades d'incubation (E9 à E12) entraîne également une augmentation du nombre de fibres musculaires 16 jours après l'éclosion chez le dindon (Maltby et al., 2004), tandis qu'une augmentation de +1,7°C 12h/24h (65% HR) de E7 à E16 augmente de 39g le poids du filet chez les poulets de chair âgés de 70 jours (Piestun et al., 2013). Piestun et al., (2009) ont aussi montré une augmentation du poids corporel chez les animaux ayant subi une MT de +1,7°C et 65% d'humidité relative de E16 à E18 (3h/24h) ainsi qu'une hypertrophie musculaire plus importante et une augmentation de la prolifération des cellules musculaires. Ces résultats apportent non

seulement un gain potentiel intéressant, mais démontrent également que la programmation embryonnaire peut affecter la physiologie animale tout au long de sa vie.

De plus, la production de viande pour la plupart des animaux adultes est principalement déterminée lors de l'embryogenèse car le nombre de myofibrilles n'augmente pas après la naissance et l'augmentation de la masse musculaire durant la période d'élevage dépend principalement de la longueur et de l'épaississement des fibres musculaires préexistantes (Enesco and Puddy, 1964). Les recherches faites chez la volaille semblent donc suggérer que la manipulation thermique pourrait être une nouvelle stratégie pour améliorer l'efficacité et la qualité de la production de viande.

#### 4.3.4. Programmation thermique chez le canard

Très peu d'études ont été faites sur l'impact d'une manipulation thermique embryonnaire chez le canard, mais des chercheurs chinois se sont intéressés à appliquer cette technique chez le canard Pekin principalement utilisé pour la production de viande en Asie (Adzitey and Adzitey, 2011). Toutefois, des résultats montrent une inhibition du développement du pectoralis major pendant l'embryogenèse ainsi qu'à l'éclosion, après une augmentation de +1°C 24h/24h en fin d'incubation de E10 à E27 (Li et al., 2017a) avec une humidité relative de 65% pour les groupes TM et le contrôle. Ces résultats sont contraires à ceux obtenus 2 ans plus tôt par (Liu et al., 2015b) qui étaient encourageants pour la filière viande des canards Pekin. Ils avaient pu observer que l'augmentation de la température d'incubation de +1°C 24h/24h et 86% d'HR pendant les jours embryonnaires E11 à E24 entraînait une augmentation des fibres musculaires à gros diamètre. De façon plus anecdotique, ils observaient également une augmentation du poids de foie deux semaines après l'éclosion (Liu et al., 2015b), associée à une augmentation de l'activité et de l'expression de la FAS (fatty acid synthase) hépatique qui est une enzyme impliquée dans la lipogenèse (Wang et al., 2014). Bien que ces résultats n'aient pas d'impact sur la production de viande, ils **suggèrent que la manipulation thermique embryonnaire chez les canards pourrait améliorer le stockage des lipides dans le foie**, au moins à court terme.

Nous avons vu que les mécanismes mis en jeu lors d'une programmation embryonnaire sont de plusieurs types. Parmi eux, la modification épigénétique semble majeure (Gibney and Nolan, 2010), puisqu'elle est observée dans les 3 programmations vues précédemment (nutritionnelle, lumineuse et thermique). Yossifoff et al., (2008) ont

notamment montré l'implication de la méthylation dans la régulation de l'expression hypothalamique du facteur de transcription BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) codant pour des facteurs de croissance après une acclimatation à la chaleur de 24h à 37,5°C contre 30°C pour les contrôles 3 jours après l'éclosion suivie d'un choc thermique à 37,5°C 10 jours après l'éclosion.

Un autre mécanisme possible serait la réponse neuroendocrinienne centrale qui pourrait moduler, d'une part, les pertes de chaleur de l'animal (thermolyse) au niveau périphérique (répartition du flux sanguin par exemple) et, d'autre part, modifier la production de chaleur (thermogenèse) ainsi que le stress occasionné par la contrainte thermique (Sanin et al., 2015). L'acclimatation périnatale induirait une modification des seuils de réponse aux changements de température ambiante pendant la période embryonnaire. Pendant le développement embryonnaire, le système thermorégulateur neuroendocrinien est encore plastique, notamment la thermosensibilité des neurones de l'aire préoptique de l'hypothalamus antérieur (Tzschentke, 2007). Ceci contribuerait à la modification à long terme de la plage de température de l'animal et donc des seuils de réponse (flux de chaleur, comportement...) qui permettrait de réagir plus rapidement aux changements environnementaux ultérieurs (Tzschentke, 2008). L'acclimatation périnatale à la chaleur aurait ainsi pour conséquence une augmentation de la thermolyse et une diminution de la thermogenèse (Tzschentke and Basta, 2002). Cette affirmation est accréditée par la diminution des concentrations plasmatiques en triiodothyronine T3, hormone thyroïdienne qui régule la thermogenèse, observée dans plusieurs expériences d'exposition périnatale à la chaleur (Yahav and McMurtry, 2001; Yahav et al., 2004b; Piestun et al., 2008b).

En conclusion, une programmation thermique contrôlée appliquée pendant une période critique est capable d'affecter le développement d'un animal aussi bien positivement que négativement. Quand elles sont maîtrisées ces manipulations environnementales qu'elles soient lumineuses, nutritionnelles ou thermiques chez les oiseaux pendant le développement embryonnaire ou après l'éclosion peuvent constituer un outil puissant pour améliorer la productivité des animaux dans l'industrie.

# Objectifs de la thèse

Comme nous venons de le voir dans l'étude bibliographique, différents protocoles de manipulations thermiques pendant la période embryonnaire ont été testés puis améliorés chez le poulet et le canard Pékin par de nombreuses équipes de recherche, dans le but d'améliorer leurs performances. Cette technique étant facilement applicable au cadre industriel ainsi que dans la recherche, nous avons projeté d'étudier l'impact d'une MT pendant l'embryogenèse chez le canard mulard qui partage la moitié de son patrimoine génétique avec la race Pékin.

**Le premier objectif** de ce travail était de décrire la mise en place embryonnaire des voies métaboliques impliquées dans la stéatose hépatique, afin de déterminer une période durant laquelle une modification de la température d'incubation permettrait potentiellement de programmer une réponse métabolique optimisée au cours du gavage. Pour cela nous avons prélevé des embryons de canard mulard tous les 4 jours embryonnaires de E4 jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour post éclosion (J4) puis nous avons analysé l'expression de gènes principalement impliqués dans le développement, le métabolisme lipidique et glucidique. L'analyse a été faite de E12 à J4 sur les foies des embryons car avant le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire le foie était impossible à prélever. Suite à ces analyses nous avons mis en évidence un pic d'expression pour de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique autour du jour embryonnaire E20. Ces résultats n'ont pas été obtenus avant la mise en place du second objectif qui visait à déterminer pour la première fois les effets potentiels d'une MT embryonnaire sur différents critères zootechniques et physiologiques au cours de l'élevage (température corporelle de surface, croissance, paramètres sanguins...) et à long terme, en réponse au gavage sur le métabolisme hépatique et la stéatose hépatique chez le canard mulard.

Pour **ce second objectif** nous nous sommes donc appuyés sur les études effectuées chez les poulets et le canard pekin et avons mis au point trois conditions de MT en réunissant les meilleurs paramètres. Un premier groupe a été soumis à une augmentation de température continue (+1°C, 24h/24h), un second à une hausse discontinue (+1°C 16h/24h) pour tenter d'optimiser l'éclosabilité, puis un 3<sup>ème</sup> groupe a été exposé à une hausse discontinue de 1,5°C (16h/24h) dans le but d'augmenter l'effet potentiel attendu. Les différents paramètres d'incubation de ces groupes ont été modifiés par rapport à un contrôle (37,6°C, 24h/24h), pendant 50% de la période totale d'incubation (E13 à E27).

Nos résultats ont montré que toutes nos MT embryonnaires augmentaient significativement le poids de foie (jusqu'à +16,9% ;  $P < 0,0001$ ) après gavage, par rapport au groupe contrôle (sans MT), associé à une augmentation du contenu lipidique dans les trois groupes MT (+2,5 à 3%). Ces résultats démontrent donc la reproductibilité de cette technique, et ouvrent la voie à une nouvelle procédure simple et peu coûteuse pour la filière. Cependant, deux des groupes MT, présentant la même augmentation de température cumulée (+332°C) présentaient également une baisse d'éclosabilité et un taux de fonte lipidique à la cuisson plus élevé. Ceci laisse penser qu'une optimisation de la manipulation thermique embryonnaire pourrait être envisagée pour améliorer la qualité du foie gras, notamment en choisissant une MT modérée et discontinue. C'est dans ce sens que l'étude d'ontogenèse pourra être exploitée, dans le but d'améliorer la technique en ciblant potentiellement des fenêtres d'expression de gènes d'intérêt.

**Enfin dans une 3eme partie**, nous avons étudié l'expression de gènes d'intérêt impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique, sur les échantillons prélevés lors de la seconde expérimentation, avant et après gavage. L'hypothèse de départ de ce travail était donc que les MT embryonnaires pourraient induire une modification du métabolisme énergétique chez le canard mulard adulte et ainsi améliorer ses performances en réponse au gavage.

# Matériels et Méthodes

Ce chapitre « matériels et méthodes » rassemble la description des techniques utilisées lors des deux expérimentations qui ont été conduites au cours de cette thèse. La première expérimentation nommée « **OntoDuck** », porte sur l'étude d'ontogenèse des gènes impliqués dans le développement, le métabolisme du glucose et des lipides ainsi que le stress chez le canard mulard au cours de l'ontogenèse. La seconde portant sur la comparaison de trois manipulations thermiques embryonnaires chez le canard mulard et un contrôle sera nommée « **DuckProg** ». La troisième nommée « **RNADuck** », porte sur l'étude de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides, du stress chez le mulard avant et après gavage. Toutes les procédures expérimentales incluant des canards ont été menées en accord avec les lois françaises pour le bien-être animal à des fins de recherche. Le protocole mis en place a reçu un avis favorable du comité d'éthique du Grand Sud-Ouest (n°73) sous la référence du dossier 201805250850236-v3.

### **Experimentation OntoDuck (article 1)**

#### **Incubation**

Un total de 286 œufs de canards mulard, issus de mères âgées de 46 semaines (génotype H85, fourni par la société Grimaud Frères Selection, Roussay, France) ont été conservés à température ambiante pendant 3 jours avant la mise en incubation à 37,6°C et 50% d'humidité relative (HR) moyenne pendant toute la période d'incubation. Tous les œufs ont été retournés à 90 ° toutes les 3 heures. La température et l'hygrométrie ont été mesurées en continu par un capteur (KIMO). Les œufs non fertiles ont été exclus par mirage à E10, avec un glissement des œufs restants pour éviter toute perturbation de la température locale causée par l'apparition d'un trou. À E27, tous les œufs ont été placés dans le même éclosoir à 37,3°C et à 80% d'HR. Le deuxième jour, les canetons ont été transférés dans une salle d'élevage où la température ambiante a été ajustée à 26-28 ° C et le régime de départ (PALMA07) disponible à volonté. Les foies de 30 animaux sélectionnés au hasard ont été échantillonnés tous les 4 jours de E12 à J4.

Les échantillons ont été congelés dans de l'azote liquide pour l'analyse de l'ARN. L'ARN total a été isolé à partir de tissu congelé selon la méthode du ribozol (VWR Life Science). La concentration totale en ARN a été mesurée par spectrophotométrie (densité optique à 260 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques Biotek EPOCH 2 avec la plaque Take3, et

tous les échantillons ont été normalisés à 500 ng/μl. L'intégrité de l'ARN total a été analysée par électrophorèse. Le protocole de RT a été le même que pour la première expérimentation.

### **Conception des amorces**

Afin de nous assurer une hybridation correcte des amorces sur les ARNm du canard mulard, nous avons construit nos amorces en partant des séquences les plus conservées pour chaque gène étudié. Car de nos jours le seul palmipède séquencé est le canard commun. Pour cela les séquences protéiques de l'homme, de la souris et du canard commun ont été alignées sur MultAlin (Corpet, 1988), les exons les plus conservés ont été identifiés. Ces exons sont ensuite collés dans le logiciel Primer3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) afin de construire des amorces spécifiques. Ensuite les couples d'amorces ont été sélectionnés pour qu'au moins une des deux amorces présente un chevauchement sur deux exons séparés d'un intron. Enfin, le produit PCR doit contenir au moins un exon entier. L'ensemble de ces spécificités nous ont permis d'éviter au maximum l'amplification d'ADN génomique.

### **Test des amorces en qPCR**

L'amplification et la quantification des ADN complémentaires (ADNc) ont été faits à l'aide du CFX384. L'analyse a ensuite été faite *via* le logiciel CFX Maestro (Biorad). Toutes les validations ont été réalisées dans des plaques 384 puits avec un mix réactionnel SYBr Green FastMix (Quanta) selon le programme suivant : 10 minutes à 95°C ; 40 cycles d'amplification avec dénaturation à 95°C pendant 3 secondes puis hybridation / amplification à 60°C pendant 30 secondes.

Un mélange (pool) de tous les échantillons a ensuite été dilué en cascade au demi de façon à obtenir 5 points de gamme (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320). Les tubes correspondants aux « Blancs ADN et RT » ont également été mélangés et dilués au 1/75ème. Après amplification, les amorces ont été validés s'ils remplissaient les conditions suivantes :

- 95% d'efficacité minimum
- r2 compris entre 0.98 et 1
- Un seul pic sur la courbe de fusion
- Aucune amplification dans les contrôles négatifs

Enfin, la taille des produits PCR a été vérifiée sur gel d'électrophorèse à 3%. La taille expérimentale identifiée grâce à un marqueur de poids moléculaire, a été comparée à la taille attendue du produit. Les séquences des amorces validées et utilisées dans les 3 articles sont compilées dans le Tableau 2.

## Quantification de l'expression des gènes par qPCR

### Transcription inverse et DNase

La rétro-transcription (RT) est réalisée sur 3 µg d'ARN totaux grâce au kit enzymatique Iscript Reverse Transcription Supermix pour RTqPCR (Bio-Rad, USA) avec chaque échantillon déposé en double. L'absence de contamination par l'ADN a été assurée par un traitement à la DNase.

#### Etape de DNase

Le mix DNase est distribué dans tous les puits d'une plaque 96 puits dans lesquels sont déposés les 3 µg d'ARN et l'ensemble est placé dans le thermocycleur Biorad T100 suivant le programme : 30 minutes à 37°C. Puis une enzyme est nécessaire pour inactiver la DNase grâce à de l'EDTA à 65°C / 10 minutes.

<i>Mix DNase</i>	Volume par réaction (µL)
<b>Buffer 10 X</b>	1
<b>Dnase 1</b>	0,5
<b>DEPC</b>	2
<b>Vol. tot</b>	<b>3,5</b>

La RT intervient après l'étape DNase. Pour cela le mix RT auquel on ajoute de la luciférase (à 100 pg/µl) est distribué dans tous les puits de la plaque 96 puits. Une fois vortexé et centrifugé, chaque puits est divisé en 2 dans les puits d'une nouvelle plaque (384 puits) et l'ensemble est placé dans le CFX384 suivant le programme: 25 ° C / 5 min, 46 ° C / 20 min, 95 ° C / 1 min. La luciférase ajoutée dans le mix permet d'avoir un ARN exogène (Promega) présent en quantité constante et connue dans tous nos puits et sera donc l'un des gènes de référence pour la normalisation des données comme vu précédemment chez (Desvignes et al., 2011; Marandel et al., 2012).

La réaction de transcription inverse a été effectuée dans un thermocycleur 384 puits CFX384 (Bio-Rad, USA) et se décompose en deux étapes : une étape de dénaturation des ARN et une étape de rétro-transcription selon ce programme: 25 ° C / 5 min, 46 ° C / 20 min, 95 ° C / 1 min. 2 contrôles négatifs différents ont été réalisés afin de vérifier l'absence de contamination en ADN génomique lors de l'amplification. Le premier contrôle est un blanc sans ARN de départ permettant de vérifier la contamination éventuelle des réactifs (nommé Blanc RT), le second est un blanc sans enzyme de rétro-transcription permettant de vérifier la contamination possible de l'échantillon lui-même (Blanc ADN).

<b>Mix RT (échantillon + Blanc RT)</b>	<b>Volume par réaction (uL)</b>
iScript RT Supermix	4
Nuclease Free water	6
Luciferase (100pg/ uL)	1
<b>Vol. total</b>	<b>11</b>

### qPCR EvaGreen

Dans le but de limiter les effets « plaque-dépendants » suite au grand nombre de réactions envisagées, les quantifications ont été réalisées sur la plateforme GeT-PlaGe (Génopole de Toulouse, France) en utilisant la technologie Fluidigm, Biomark permettant de traiter simultanément 96 échantillons et 96 couples d'amorces pour un total de 9216 réactions par puce.

Avant tout, les échantillons (concentration = 5 ng /  $\mu$ L) ont subi une étape de pré-amplification utilisant le mix PreAmp Master Mix (Fluidigm). On dépose 1,3  $\mu$ L d'ADNc par puits avec 5  $\mu$ L de mix. La plaque est ensuite mise dans l'appareil (Veriti 96 Fast) suivant le programme : 95°C / 2 minutes, 14 cycles d'amplification comprenant la dénaturation à 95°C / 15 secondes et l'hybridation/amplification à 60°C / 4 minutes, et enfin 10°C  $\infty$ .

**Tableau 2: Séquences des amorces validées et utilisées dans les 3 articles**

Gene name	Gene Symbol	Primer sequence
Fibroblast growth factor Receptor 2	FGFR2	CGCAGGATGGTCCACTCTAT CCAGCTGGTAAGTGCAGGAT
Insulin-like growth factor 1	IGF1	TACCAAGGCATGACCAATGA AGACCTCTTTGAACGCCTGA
GATA binding protein 6	GATA6	TCAAAGGCATGCTCTGGTAA CTGTGTACAGCCCGCTTGA
Hepatocyte growth factor	HGF	GAGCACAGCTTTTTCGCTTC CCTTCCCTGACTCGGTATGA
Prospero homeobox 1	PROX1	CCGCAGAAGGTCTCTTTTG CTTGGGTACCGGTGTAAAA
Stabilin 2	STAB2	ACCTATCAACCCATGCTCCA TGCACTCAGCTGGGACTTT
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	ACTCAACACCTCAGCAACGA CCTGTGTGATCATGGTCTGG
Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 (or liver receptor homolog-1)	NR5A2	TTAGAAGCTGTGCGAGCTGA TCTGTAGGAGCAAGGCAGT
Myocyte enhancer factor 2C	MEF2C	CTGGCAACAGCAACACCTAC GGTGTGGTGTACGGTCTCT
actin beta	ActB	CCAGCCATCTTTCTGGGTA ATGCCCTGGTACATTTGGGT
Tubulin alpha 1C	TUBA1C	ATGCCAAGCGACAAAACCAT AGTGTAAAGACCTCAGAGCGT
Reelin	RELN	TTAGTGCCCTTCCAATGTC CAGCTGTGCTCAGCTTTGC
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	CAGAGACCAGGTTGCTCC CACCAACAGGTTGCTGATC
Hhexokinase 1	HK1	GAGGGAGCAGAGCTTGTGAA GCCGCATCTCCATGTAA
Glucose transporter 1	GLUT1	CGGGGATCAATGCGGTTTTTC GTGAAGGGTCTACGTCAG
Glucose transporter 2	GLUT2	GGAGTTGACCAACCCGTTTA CCCACCTCGAAGAGATGAC
Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2	ALDH3A2	CAGTCGGATCTGCACAAGAG ACCAGGACGAAGGGTAGTT
Inulin receptor	InsR	TGGAGGATACCTGGATCAGC GCAAGTCTCTTCAGCATC
5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase	AMPK	GCAAGCCTTTTGAATGCTGT TTCATAAAGCGAGGCTTTGG
cAMP-response element binding protein 2/ Activating transcription factor 4	CREB2/ATF4	CAGGTCTTTTCTCTGCTG CCTGGGATCTCGGATACT
Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	ALDH7A1	GGAAGCTGGTCTCATTTGA ATGGCCAGGCTTTCTGAAG
AKT serine/threonine kinase 1	AKT	GGGAAGAATGGACGAAAGCC AGTGCTTTTCCAGTAGCT
Carbohydrate-responsive element-binding protein	ChREBP (MLXIPL)	TCTTCCACATGCAAAACTG ACCATGCCCTTGAAGACTC
Acyl-CoA synthetase short chain family member 1	ACSS1	GATGTGCCCTTGAAGAAGA AGCCTGGGTGTGAACAATTC
Acetyl-CoA acetyltransferase 1	ACAT1	GGTATCCCCGTGAAGAAGT TTCCACCAGCAACCATTACA
Stearoyl-CoA desaturase 1	SCD1	AGTGTGCTCACATGTTTTGG TGAAGTCGATGAAGGCTGTG
Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	ACAD11	TGGTTGTACCTCAGAGCTGT CATCCACATGAGAGGCTTT
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	PPARA	GGATGCTGGTAGCCTATGGA ACGTGCACAATGCTCTCTTG
Low density lipoprotein receptor-related protein 4 / low density lipoprotein receptor class A domain containing	LDLR4/LRP4/Ldlrad4	TGTGGCCTTCAGAAGCTCG ATCTCGTCTGCATGTAGGG
Peroxisome proliferator activated Receptor gamma	PPARG	CCCAAGTTTGAGTTCGCTGT GCTGTGACGACTCTGGATGA
Fatty acid binding protein 4	FABP4	AATGGCTCACTGAAGCAGGT TGGCTTCTCATGCTTTTC
Choline/Ethanolamine Phosphotransferase 1 CEPT1	CEPT1	CTGCTGTGCAGCTCTTTGAA CGCAGTATCGAAGCAAATCA
Acyl-CoA oxidase 1	Acox1	CATGTTTGAAGTGGGCAAGA TTTTAGGGCAGGAAAATTG
ATP citrate lyase	ACLY	ACCCACGTTTGGACTATGC GCTTCAAGCGCTCTGATCT
Acetyl-CoA acyltransferase 2	ACAA2	AGTTGAGGACACCTTGTGG TGCATGCTTCTTTCCCTTT
Cluster differentiation CD36/ Fatty acid translocase	CD36/FAT	AGTTTGCCAAAAGGCTTCAA CGAGGAACACCACAGAACCCT
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1	GPAT1	ACAACCTCAGCGGTCTGTT GCGCTGAGGTAGGAACGTAG
Carnitine palmitoyl transferase 1A	CPT1A	GATTTGGACCAGTGGCTGAT GAAGGTTGCTTTGCACCAAT
Lipase C hepatic type	LIPC	TCTGCCATCACAGTTCTTG TGTTTCCCTGCTTTCACCTC
Acyl-CoA synthetase short chain family member 1	ACSS1	GATGTGCCCTTGAAGAAGA AGCCTGGGTGTGAACAATTC
Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3 (NR1H3)	LXRa/NR1H3	CATCTCGAGCTACAAATCCA GTGTGCTGAGCTCTCCAC
Diacylglycerol O-acyl transferase 2	DGAT2	TGGGGCTTGTACCGTACTC TGGAGAAGATGGGCTGAATC
Fatty acid synthase	FASN/ FAS	TGAAGAAGCTGGGTGGAG CTCCAAATAGGTGCGGTGAT
Glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1	CGTTTTTGGTCCAGCATGA ATCCCAAATGCCCATATTT
Heat shock protein 90 alpha family class A member 1	HSP90AA1	AGACCATTTGGCTGTCAAGC CAGCTCTCACAGTTGTCCA
ST13 Hsp70 Interacting Protein or Suppression Of Tumorigenicity 13	ST13	TGCAACCAAGAGCTGAGAAA CCTGTCTGCTTCTTCTTCC
DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A2	DNAJA2	CTGACTGCAACGGAGAAGGT CTGGAGCTGATCTGCTTCT
Glutathione S-transferase theta 1	GSTT1	TGCAGCAAATGGAGACCTG GGCCTTCAAACCTTCTCA

Heat Shock Factor Binding Protein 1	HSBP1	ACTGGAAGGCGAGAACAAGA TCGGTAATCCAAAGGGACTG GCCAGATGCCCTACACAGAT GGTACCGTTTGGAATCAGGA CTACTTTGTGCTCTTCTGCCATTTT TGGCTTCTGTCTCATTCTACCAC CATGTTTGAGTGGGCAAGA TTTTCAAGGGCAGGAAAATTG GCATTCTCAGTTTCGCAAT TGTGGAGTCCACAGTCTCT GGCTGGCTTATACAGGAGA CTCTTTCTTGGCCATTG TCTCACCGTGACTTGAGTGC TCCCAGCAGAAGGTGAAGAT TGCAGATGGACAGAGTCGAG GGATCGAGTCTGAAAACCT CGTAACTGGCAGCACAAGAA TGCTGATCCAGTCTCAAAC CAAACAGCTCGACCTGAAGC GGTGTCTTCCAGCCATCT TTCATCAGCCATCCAGCAG AATGGCCAGTCTCTCAGTGC ACTGGGAGGCTATCTTGTGG CAAGAGCCAAGCATACCAG GCAGTGGGACTATGGGCTAT CTGCTGCTGTCTCTGCTATG TTCTCAGAACTCCGTGGC GGCTCTGTGATACAGCTCG CGCTACATGGGAAAGGTGT AAGGTGAGCAATGTGACGGT TGGAACTGACTTGGTGA CCTTGGAGTGGCTTGAATA GTCCACTGCATCTCCGACTT CACATCCAGGTCGAATCTCT CTGCAGAGCTGAAAGGTC CACTGCCACATCAATTTCTT CCTCGACACCGACTACTGCT CACCTTGGTGACTGCGTGT TATGGCAATGCAGACAT ACGCACTGCCTGTAAACCT ATCCCAGAACATCCACAA CAGCCGAGAGGTGGTGTAT GGGGCAATGGAGCCAAAGTAT AAATCCACCCATCCAGGCAG TGCAACCAAGAGCTCAGAAA CCTGCTGCTTGCCTTCTCC GCCAGATGCCCTACACAGAT GGTACCGTTTGGAATCAGGA GAAAACATCAAGCCAAAGGT CTTCTTCCACAGGGCCTTA AAGCGCACTCTCAGCTCTTC TTGTCTAGCTGGCATCACG GCCCTTCAAGGTGTGTGAAA TGCATGGGTAACCTTCTCC TTCCCTCCAGTAACGCTCCAC ACTTTCAAGGTGCTCCGTCAC CAAGGCACACCAAGAGCAAC ATGGATGGAAACGGCCATT TCTAGAGAAACAGCAAGGGG ACTTGTCCCGTCTCCTGA AAGAAGCTCACGCAGCAGAT CCCCACTCTCCCTTTGAGA ATGCCAGACTGATGATGGGG ATCAGCGGATGAGGAATGGC GACAGGACATGGATGTGGCA GGCCTCCACTTGGACATTGA CGGACGAAAGCCCTTCCATA TGTAGCACACACACTCCAG CCGACGGGAAGATATGCCCA CTGCCAGGGCACTCTGTATC AGTACGACAACGACGTGACC GCTGAGCCTTGTTCACAGC GCTCAAGCTGCTGGGAGAA CTTCTCCGGGGTTCAACAA AGGAGGGGAGACTGCAAGAA AAACATGTCCAGAGCCGTT GCACAAACCAGAGCCACAG GGTCTTCAATGGCAGCTCA CCTCACCGACTGACCAAAA GACTTGGCGCAGGAGAAAAG ACACACACGCAAGGGATGAA AACACCAGCTTTTCCATGC GCGAGCTTTCGAGCAAGATG ATCCGAAAGGAAAGAGCCT ATGGCTGAAGAGTGCAGT AAGGCTTGCATAGCCAAAA ATGAGGAATCCATGGCTGA TCACTGGAATGGCATATTG TCGGAGCAGAGATAACGACC AGTGCAATTTCCGGGTCTATA CAATGGGACTATTGCGGAGT GCTCCAGGTCATGGATGAAT GTAAGAAATGGTGGCTTGA TCTGAACGAATGGGTTTTCC
Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	CYP2E1	
elongase of very long chain fatty acids	ELOVL6	
Acetyl CoA Carboxylase	ACC	
Sterol O-Acyltransferase 1	SOAT1	
Acyl CoA Synthetase Long-chain 1	ACSL1	
Apolipoprotein B	ApoB	
Microsomal Triglycerides Transfer Protein	MTTP	
Very Low Density Lipoprotein Receptor	VLDLR	
Apolipoprotein A2	APOAII	
Oxysterol Binding Protein Like 3	OSBPL3	
Glucose Transporter 8	GLUT8	
Sodium Glucose Linked Transporter 1	SGLT1	
Glucose Transporter 3	GLUT3	
Enolase Alpha	ENO1	
Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A	SDHA	
hexokinase 2	HK2	
pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1 subunit	Pdha1	
Transforming growth factor beta 1	TGFB1	
hepatocyte nuclear factor 4 alpha	HNF4	
Lymphoid enhancer-binding factor 1	LEF1	
TIA1 Cytotoxic Granule Associated RNA Binding Protein	TIA1	
ST13, Hsp70 interacting protein	ST13	
Cytochrome P450 2E1	CYP2E1	
Heat shock factor protein 3	HSF3	
heat shock protein family A (Hsp70) member 2	HSPA2	
heat shock protein family A (Hsp70) member 5	HSPA5	
DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B12	DNAJB12	
Nuclear Receptor Corepressor	NCOR	
Jumonji Domain Containing 1C	JMJD1C	
Iodothyronine Deiodinase 1	DIO1	
COP9 Signalosome Subunit 2	COPS2	
Thyroid Stimulating Hormone Subunit Beta	TSHb	
Ubiquitin Specific Peptidase 16	USP16	
Mediator Complex Subunit 21	MED21	
Proteasome Subunit Alpha 1	PSMA1	
Zinc Finger HIT-Type Containing 3	ZNHIT3	
Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 12	PSMD12	
Thyroid Hormone Receptor Beta	THRb	
Thyroid Hormone Responsive SPOT14	SPOT14/THRSP	
Protein-L-Isoaspartate (D-Aspartate) O-Methyltransferase	PCMT1	
Iodothyronine Deiodinase 3	DIO3	
Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase	mTOR	
lectin, mannose binding 1	LMAN1	
RNA Polymérase II	POL2RC	
Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase	PARK2	
ubiquilin 1	Ubqln1	

Les mix réactionnels sont décrits dans le Tableau.

Réactifs	µL	Puce 96x96 (µL)
Eau	1,5	159
Pool de primers à 0,2 µM	1,25	132,5
Fluidigm PreAmp Master Mix	1	106
Total	3,75	397,5

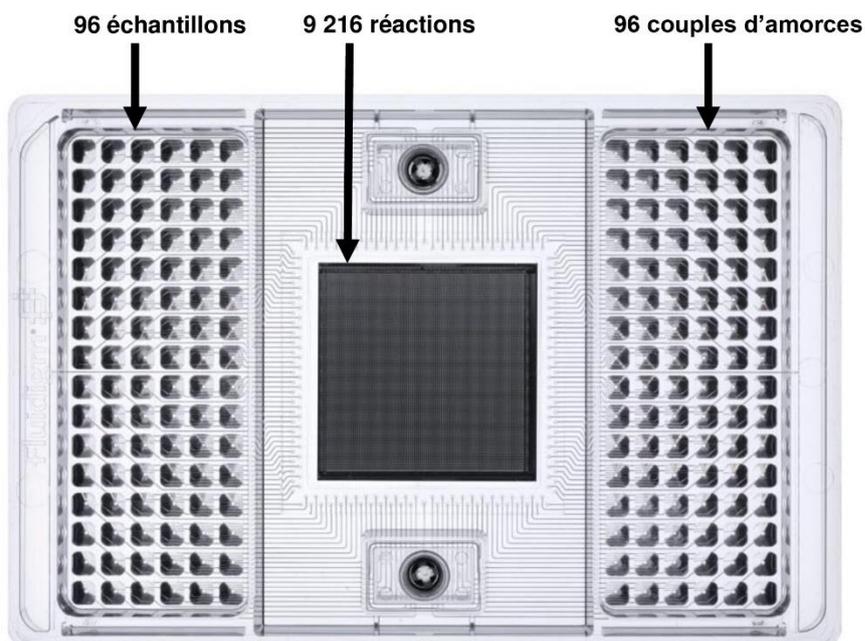
Les échantillons sont ensuite soumis à l'exonucléase afin d'éliminer les ADN double brins selon le programme : digestion 37°C / 30 minutes, inactivation 80°C / 15 minutes, puis 10°C ∞. Les mix réactionnels sont décrits dans le Tableau.

Réactifs	µL	Puce 96x96 (µL)
Eau	1,4	147
Exonuclease I Reaction Buffer	0,2	21
Exonuclease I	0,4	42
Total	2	210

Enfin, la puce BioMark a été préparée et remplie d'une part avec les échantillons (sample) et d'autre part avec les amorces (Assay). Pour faciliter les dépôts, les différents composés sont tout d'abord répartis dans deux plaques de 96 puits. La première pour les ADNc (2 µL dilués au 1/5) avec 6 µL du mix décrit dans le Tableau. La seconde pour les amorces (2 µL à 20 µmol.L<sup>-1</sup>) avec 6µL de mix (2 volumes de 2X Assay Loading Reagent pour 1 volume de TE low EDTA).

Sample Pre-Mix	Puce 96x96 (µL)
2X TaqMan Gene Expression Master Mix	440
20X DNA Binding Dye Sample Loading Rgt	44
20X EvaGreen	44
TE low EDTA	132
Total	660

Les deux plaques sont ensuite distribuées comme montré dans la Figure.



La plaque a enfin été placée dans le BioMark (Fluidigm) et l'amplification a été lancée. Le programme d'amplification a été décrit dans le Tableau.

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

L'étape « Thermal mix » Permet une élévation de la température de la plaque jusqu'à 70°C permettant une meilleure diffusion des ADNc dans les chambres réactionnelles.

L'étape « UNG » est dépendante du mix utilisé qui contient de l'Uracil DNA Glucosidase (UNG). Cette enzyme va dégrader les contaminants double brin éventuellement présents dans le milieu réactionnel. L'étape « hold » permet de dénaturer l'enzyme avant les cycles de PCR afin d'éviter qu'elle ne dégrade les brins néoformés.

Toutes les données ont été recueillies puis traitées par le logiciel Fluidigm Real-time PCR analysis (Fluidigm corporation v4.5.1).

### Analyse et traitement statistique des résultats

La fonction selectHKgenes avec la méthode "Vandesompele" du package SLqPCR a été utilisée avec le logiciel RStudio (version 1.2.1335) pour choisir les 5 gènes de références les plus stables. Les 5 gènes de référence pour la quantification relative des niveaux d'ARNm des gènes cibles étaient SDHA, GLUT8, PDHA1, POL2 et la Luciferase. La

luciférase est un ARN exogène (Promega), ajouté à chaque échantillon lors de la transcription inverse (100 pg/μl) pour permettre la normalisation des données comme décrit précédemment (Desvignes et al., 2011; Marandel et al., 2012). La pente d'une courbe standard utilisant des dilutions en série d'ADNc a permis de mesurer l'efficacité (E) de la PCR. Dans tous les cas, les valeurs d'efficacité de la PCR étaient comprises entre 1,95 et 2. Les analyses ont été réalisées avec RStudio et les résultats ont été exprimés sous la forme  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl et al., 2004) avec

$$\text{Relative gene expression} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}}}{\text{geomean}((E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}})}$$

$$\text{Relative gene expression} = \frac{2^{\Delta Ct_{\text{target}}}}{(2^{\Delta Ct_{\text{SDHA}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{GLUT8}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{PDHA1}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{POL2}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{luciférase}}})^{\frac{1}{5}}}$$

Ct= threshold cycle

$$\Delta Ct_{\text{target}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{sample}}$$

$$\Delta Ct_{\text{ref}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{sample}}$$

Ct<sub>control</sub> = average Ct of all samples

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graphpad Prism v8 (licence n°GP8-1598457-RJQD-5E2EC). Lorsque l'ensemble des données présentait une distribution normale (évaluée par le test de Shapiro-Wilk), une analyse de variance paramétrique (ANOVA) était effectuée, suivie d'un test de comparaison multiple de Dunnett en tant qu'analyse post-hoc. Lorsque la distribution normale n'a pas été démontrée, un test non paramétrique de Kruskal–Wallis a été effectué, suivi d'un test de Dunn en tant qu'analyse post-hoc. Les données sont présentées sous forme de boîtes à moustache, les boîtes allant du 25ème au 75ème percentile, et les moustaches de la valeur la plus faible à la valeur la plus haute. Dans tous les cas, les différences entre les groupes étaient considérées comme statistiquement significatives si la valeur de P < 0,05.

La fonction heatmap.2 du package gplots a été utilisée pour dessiner des heatmaps avec RStudio. Le package corrplot a été utilisé pour dessiner la matrice de corrélation, ce

package contient des algorithmes pour réordonner la matrice en fonction du degré de corrélation entre les variables (Méthode Pearson).

### **Expérimentation DuckProg (article 2)**

Pour cette étude nous avons utilisé 2000 oeufs de canards mulards de type génétique H85 provenant de la société Grimaud Frères Sélection (3 la corbière – Roussay, 49450 Sèvremoine, France).

#### **Incubation**

Ces oeufs ont été répartis dans 4 incubateurs différents de l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras (INRA, UEPFG au « Domaine d'Artiguères » (Benquet, France, numéro d'agrément : B40-037-1), correspondant à 4 modalités expérimentales (500 oeufs/groupe) : un groupe contrôle et 3 groupes manipulés thermiquement (MT). Les conditions d'incubation des 4 groupes expérimentaux ont été :

- T1 (contrôle) : incubation à température (37,6°C, 24h/24h) et hygrométrie (47%) constantes pendant toute la durée d'incubation
- T2 : incubation à 38,6 °C (+1°C) 24h/24h de E13 à E27
- T3 : incubation à 38,6°C (+1°C) 16h/24h de E13 à E27
- T4 incubation à 39,1°C (+1,5°C) 16h/24h de E13 à E27

L'hygrométrie a été ajustée à 63% pour les 3 groupes MT. Dans chaque incubateur, la température et l'hygrométrie étaient mesurées en continu par un capteur équipé de sondes à distance (KIMO, KH200). Les capteurs ont été posés dans un panier d'œufs. L'inclinaison initiale des œufs était d'environ 45 ° à droite. Puis toutes les 3 heures l'inclinaison alternait entre 45° à gauche et 45 ° à droite. Les œufs ont été arrosés à partir de E9 avec de l'eau à t° C ambiante, à l'aide d'un tuyau équipé d'un asperseur permettant la formation de micro-gouttelettes. Les œufs non fertiles ont été exclus par mirage à E10, avec un glissement des œufs restants pour éviter toute perturbation de la température locale causée par l'apparition de trous. À E27 un 2<sup>ème</sup> mirage a été effectué, tous les œufs ont été placés dans le même éclosoir à 37,3 ° C et 80% d'humidité. Les canards nouvellement éclos ont été enregistrés chaque jour de E27 à E31 et les éclosabilités ont pu être comparées à l'aide d'un test de Chi2.

## Elevage

Les canetons ont été identifiés à l'éclosion par une bague alaire et répartis dans 8 loges à raison de 2 loges par traitement et de 100 animaux par loge (figure 21). Ils ont été élevés sous les mêmes conditions de lumière et de température. La température des bâtiments se situait entre 26-28°C les 4 premiers jours d'élevage puis une légère baisse de 1°C est effectuée tous les 3 jours. Les animaux ont été nourris *ad libitum* avec un aliment de démarrage de 0 à 4 semaines d'âge (EMA 2800 Kcal, 17,5% PB), puis avec un aliment de croissance de 4 à 8 semaines d'âge (EMA 2800 Kcal, 15,5% PB). A partir de la 8ème semaine, un rationnement horaire est pratiqué pour la période de finition jusqu'à la mise en gavage avec une distribution *ad libitum* 1h/jour. Le poids corporel, les températures de surface (Evoluscan+ thermomètre infrarouge) et la consommation alimentaire ont été enregistrées aux jours 1, 31, 45, 59, 70, avant (J83) et après le gavage (J95). La prise de température est la moyenne de 2 prises sur la croupe du canard sans plume. Les gains quotidiens moyens étaient calculés à ces périodes. A 15 jours d'élevage, 30 mâles et 20 femelles par traitement ont été choisis aléatoirement et abattus pour réaliser des mesures zootechniques.

## Gavage

A l'âge de 12 semaines, les canards prêts à gaver (PAG) ont été placés en cages collectives pour un gavage en 21 repas (figure 22) dont la quantité a été définie selon la capacité d'ingestion du type génétique, avec 53% de mix Palma Maisadour (98% maïs) et 47 % d'eau. Durant toute la période, le gavage a été réalisé par un seul gaveur et les animaux concernés mis en cages collectives à raison de 4 animaux par cage (1250cm<sup>2</sup>/canard).

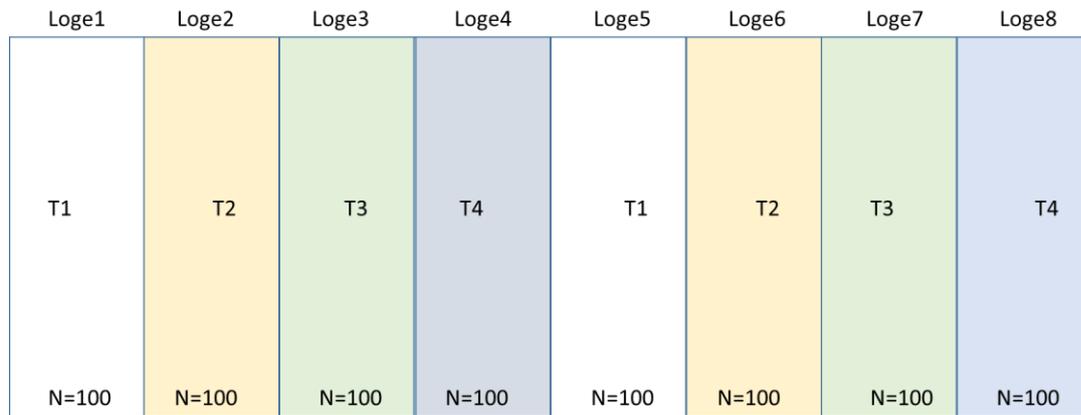


Figure 21: Schéma de la répartition des traitements par loge

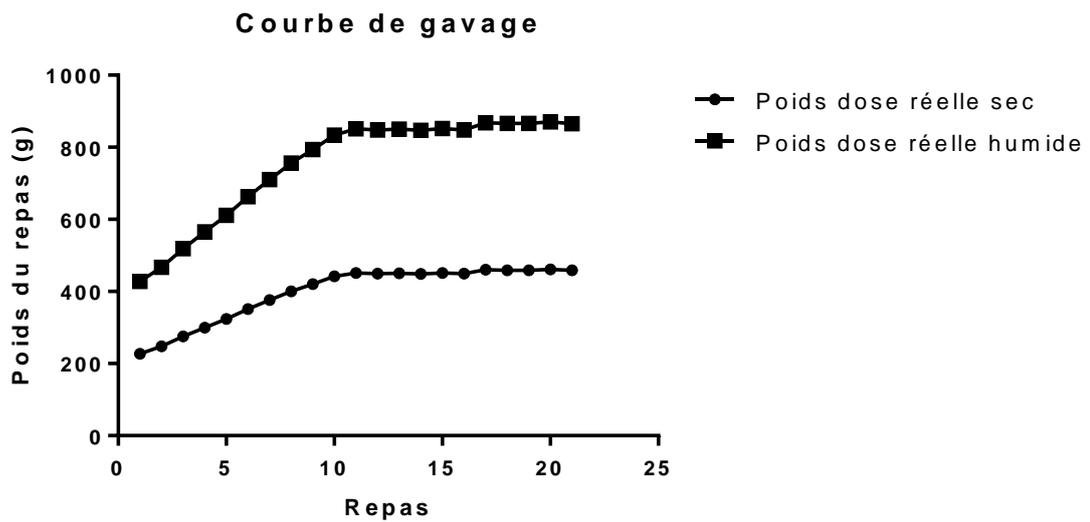


Figure 22: Courbe de gavage utilisée pour l'expérience DUCKPROG

## Prélèvements

Les prélèvements suivants ont été effectués à chaud et pesés : cuisse droite, foie, pectoralis major et gras abdominal. Avant gavage (J83), 40 animaux (choisis aléatoirement) par groupe ont été abattus, puis 52 animaux 10h après le dernier gavage (J95) pour réaliser les mêmes analyses. Les échantillons ont directement été congelés dans l'azote liquide puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur traitement. Les canards ont été tués par exsanguination après électronarcose, conformément au règlement du Conseil européen (Règlement (CE) n° 1099/2009 du 24 septembre 2009 relatif à la protection des animaux au moment de leur mise à mort) à la l'unité expérimentale Palmipèdes à Foie Gras (INRA, Artiguères, France). La consommation alimentaire quotidienne a été déterminée collectivement jusqu'à J83 (deux enclos collectifs par groupe) et individuellement entre J84 et J95, correspondant à la période de gavage. Le ratio de conversion des aliments en poids total par animaux (FCR) et le ratio de conversion des aliments en poids de foie par animaux (L-FCR) ont été déterminés par la consommation cumulée individuelle calculée (ou connue lors du gavage) et la prise de poids moyenne (FCR) ou la prise de poids du foie (I-FCR) (différence entre le poids individuel du foie après gavage et le poids moyen du foie par groupe avant gavage) respectivement. Des prélèvements sanguins sur tubes EDTA ont aussi été effectués au moment de l'abattage après section de la carotide à J15, J84 et J95. Le plasma a été récupéré par centrifugation ( $2000 \times g$ , 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$ ) et congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Dosages plasmatiques

La glycémie, la triglycéridémie, le taux de cholestérol et d'acides gras non estérifiés (AGL) ont été quantifiés par méthode colorimétrique à l'aide de kits enzymatiques (Glucose GOD-POD, SOBIODA; Tryglycérides GPO POD, SOBIODA; Cholestérol LD M, SOBIODA, NEFA HR2, ETATS-UNIS).

Dosage du glucose: 5  $\mu\text{l}$  de gamme, d'échantillon (dilué au 1/3) ou de contrôle ont été déposés par puits en triplicat puis 250 $\mu\text{l}$  de solution de travail GOD-POD a été ajouté, le tout a été homogénéisé et incubé 15 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  dans le lecteur de plaque. L'absorbance a été lue à 500nm.

Dosage du cholestérol: le seul changement est le volume de solution de travail qui passe de 250 $\mu\text{l}$  à 200 $\mu\text{l}$ .

Dosage des tryglicérides les seuls changements par rapport au cholestérol sont une durée d'incubation de 20 minutes et une lecture à 505nm.

Dosage des acides gras libres (AGL) par le kit NEFA HR2. Un mélange de 5 µl de gamme, d'échantillon (non dilué) ou de contrôle et de 150µl de la solution R1 a été réalisé. Le tout est homogénéisé puis incubé 3 min à 37°C, 75 µl de la solution R2 sont ensuite ajoutés et incubés 4min30sec à 37°C, la lecture se fait à 550nm. Les différentes concentrations plasmatiques ont été calculées sur la base d'un standard de concentration connue.

Des dosages radio immunologiques de thyroxine libre (T4), de triiodothyronine libre (T3) (RIA FT3 et FT4, Beckman Coulter) ont été appliqués à des échantillons de plasma. Les variations intra et inter-essais (CV) étaient respectivement de 6,4% et 5,5% pour T3 et de 10,29% et 7,58% pour T4. Ces dosages ont été réalisés par ONIRIS–LabOniris-LDHVet.

Les concentrations plasmatiques de corticostérone ont été mesurées à l'aide d'un kit RIA-kit à double anticorps disponible dans le commerce (MP Biomedicals, NY, USA) avec un dosage intra et inter (CV) de 7,1% et 7,2% respectivement.

### **Taux de lipides des foies et de matière sèche**

Pour prédire les caractéristiques biochimiques des foies une technique de spectroscopie proche infrarouge a été utilisée. Les spectres proches infrarouge ont été collectés grâce au Labspec® 5000 Pro spectrometer (ASD Inc., Boulder (CO), USA) avec une absorbance allant de 350nm à 2500nm et un intervalle de 1nm. Un morceau de 15g de chaque foie a été plongé dans de l'azote liquide et stocké à -80°C. Après broyage dans de l'azote liquide, les échantillons ont été desséchés dans une étuve à 105 ° C pendant 24 h (JOCE, 1971) pour obtenir la teneur en matière sèche. La teneur totale en lipides a été mesurée pour 40 foies collectés avant gavage, les lipides de 2,0 g d'échantillon ont été extraits par homogénéisation dans du chloroforme méthanol 2:1 (v /v) et mesurés par gravimétrie selon la méthode de Folch et al. (Folch et al., 1957). Pour 0 foies gras (après gavage), le même protocole a été appliqué sur 0,3 g d'échantillon. Ensuite, la teneur totale en lipides a été prédite pour tous les échantillons en utilisant une équation de prédiction développée sur les spectres NIRS selon la méthode décrite par Marie-Etancelin et al. (Marie-Etancelin et al., 2014) à l'aide de précédentes analyses. Les données de spectre ont été raccourcies de 650 à 2350 nm et transformées avec une normalisation Standard Normal Variate et Detrend 1, 10, 10, 1. L'équation de prédiction est basée sur une analyse PLS (Partial Least

Square) modifiée du logiciel Winisi® (version 4.6.8, FOSS Analytical A / S, Hilleroed, Danemark).

### **Mesure du taux de fonte**

Pour le test de fonte, des échantillons de 60 g ont été prélevés au milieu du gros lobe du foie et placés dans une boîte de conserve. Les boîtes de conserve ont ensuite été pasteurisées dans un autoclave à 85 ° C pendant 60 minutes. Les canettes ont ensuite été refroidies et stockées à 4 ° C pendant deux mois afin de reproduire la période de stockage moyenne dans le commerce. Après cette période de stockage, les boîtes ont été chauffées dans un bain-marie (75-80 ° C, 20 min), la graisse fondue a été séparée et le reste de l'échantillon a été placé sur du papier absorbant. Le taux de fonte a ensuite été mesuré comme le pourcentage de perte par rapport au poids initial du foie.

### **Analyses histologique**

Des échantillons de foie ont été fixés (7 par groupes) avec du paraformaldéhyde à 4%, inclus dans de la paraffine puis coupés en sections de 10 µm d'épaisseur.

Les lames de microscope ont ensuite été colorées avec du trichrome de Masson vert. Le protocole du Trichrome de Masson vert :

- Déparaffinage
- Coloration des noyaux par l'Hémalun de Mayer pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau courante 5 minutes
- Coloration du cytoplasme par un mélange de *fuchsine* acide et de rouge ponceau 1 minutes
- Rinçage rapide à l'eau
- Acide phosphomolybdique 1% 1 minutes, vider (ne pas rincer)
- Coloration au vert lumière 1 minute, rincer à l'alcool, déshydrater, monter les lamelles.

Les coupes de foie ont ensuite été scannées avec le scanner Panoramic 250 de 3dHistech avec un grossissement de 40x. Le degré de stéatose, de « ballooning » des hépatocytes et de fibrose a été noté sur les coupes de foie. Chaque variable a été notée de zéro (aucune) à trois (sévère). Le logiciel ImageJ (ImageJ 1.52a) a été utilisé pour mesurer le diamètre des gouttelettes lipidiques dans chaque groupe (moyenne de 2 zones représentatives par lame, n = 7 coupes de foie par groupe). L'image a d'abord été convertie en 16 bits noir et blanc, puis un seuil automatique a été appliqué avec un arrière-plan sombre et la surface des objets circulaires de plus de 48 µm a été mesurée

automatiquement. Les gouttelettes en contact ont été séparées grâce à un plugin ImageJ (binary watershed) et les objets touchant le bord de l'image ont été supprimés.

#### **Analyse et traitement statistique des résultats.**

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graphpad Prism v8 (licence n°GP8-1598457-RJQD-5E2EC). Les graphiques, les heatmaps et les matrices de corrélations ont été faites à l'aide du logiciel R. Lorsque l'ensemble des données présentait une distribution normale (suite au test de Shapiro-Wilk), une analyse de variance (ANOVA) était effectuée, suivie d'un test de comparaison multiple (Dunnett) en tant qu'analyse post-hoc. Lorsque les données ne suivaient pas une distribution normale, un test non paramétrique de Kruskal – Wallis était effectué, suivi d'un test de Dunn en tant qu'analyse post-hoc. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD. Dans tous les cas, les différences entre les groupes étaient considérées comme statistiquement significatives si la valeur de  $P < 0,05$ .

### Expérimentation RNADuck (Article 3)

Pour les échantillonnages, cf. partie DuckProg et OntoDuck.

#### **Biologie moléculaire**

Les ARN totaux ont été extraits à partir des tissus congelés suivant la méthode du Ribozol (VWR Life Science). Le culot d'ARN a été solubilisé dans un volume approprié d'eau RNase free (eau UP fisher non traitée au DEPC). Généralement, le volume de solubilisation était de 300 µL pour le foie. Les ARN extraits ont ensuite été stockés à -80°C. La concentration totale en ARN a été mesurée par spectrophotométrie (densité optique à 260 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques Biotek EPOCH2 (Take3 Plate), et tous les échantillons ont été normalisés à 500 ng / ul. L'intégrité de l'ARN total a été analysée par électrophorèse.

#### **Transcription inverse et DNase**

Cf. partie transcription OntoDuck

#### **Quantification de l'expression des gènes par qPCR**

Le protocole de PCR en temps réel sur puce 96\*96 (fluidigm) a été le même que pour l'expérience (OntoDuck) le seul changement se situe dans l'analyse des résultats qui a été faite avec une sélection de 6 gènes de références différents ici les plus stables étaient (USP9X, Actineβ, EIF3, STAB1, HPRT1 et la luciférase).

# Résultats

## **L'ontogenèse du métabolisme hépatique du canard mulard révèle différents profils d'expression entre les voies métaboliques des glucides et des lipides**

### **Résumé**

L'objectif de cet essai était d'étudier les profils d'expression de gènes d'intérêt dans le foie de canard mulard lors du développement embryonnaire, pour nous permettre d'identifier de potentielles périodes de manipulation thermique embryonnaire.

Pour cela 286 œufs de canard mulard ont été incubés. Des prélèvements de foie ont été effectués tous les 4 jours embryonnaires et analysés à partir de E12 jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour post éclosion.

Cet article rassemble les résultats obtenus sur l'expression des gènes impliqués dans le développement du foie, le métabolisme lipidique et glucidique ainsi que le stress chez l'embryon de canard mulard.

Nous avons observé que la plupart des ARNm impliqués dans le métabolisme des lipides sont surexprimés après l'éclosion (FAS, SCD-1, ACLY et ACOX1), alors que les gènes impliqués dans le métabolisme des glucides (HK1, ACAT1, GAPDH) et le développement (HGF, IGF et FGFR2) sont principalement surexprimé de E12 à E20. Enfin, en ce qui concerne le stress cellulaire, l'expression des gènes apparaît assez stable tout au long du développement, tandis qu'après l'éclosion, une augmentation de l'expression de la plupart des gènes est observée (CYP2E1, HSBP1 et HSP90AA1).

Pour la première fois, nous avons décrit l'ontogenèse hépatique au niveau de l'ARNm chez les canards mulard et mis en évidence différents profils d'expression en fonction de la voie métabolique. Ces résultats suggèrent qu'une fenêtre de programmation semble possible entre E12 et E20.

**Article 1 (BMC Genomics, 2020):**

**Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways**

William Massimino<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Aurélie Secula<sup>2</sup>, Charlotte Andrieux<sup>1</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>3</sup>, Tracy Pioche<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>, Mireille Morisson<sup>4</sup>, Anne Collin<sup>5</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>IHAP, Université de Toulouse, ENVT, INRAE, UMR 1225, 31076 Toulouse, France

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

<sup>4</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet Tolosan, France

<sup>5</sup>INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly, France

Corresponding author: marianne.houssier@univ-pau.fr

**Abstract**

**Background:** The production of foie gras involves different metabolic pathways in the liver of overfed ducks such as lipid synthesis and carbohydrates catabolism, but the establishment of these pathways has not yet been described with precision during embryogenesis. The early environment can have short- and long-term impacts on the physiology of many animal species and can be used to influence physiological responses that is called programming. This study proposes to describe the basal hepatic metabolism at the level of mRNA in mule duck embryos in order to reveal potential interesting programming windows in the context of foie gras production. To this end, a kinetic study

was designed to determine the level of expression of selected genes involved in steatosis-related liver functions throughout embryogenesis.

The livers of 20 mule duck embryos were collected every four days from the 12<sup>th</sup> day of embryogenesis (E12) until 4 days after hatching (D4), and gene expression analysis was performed. The expression levels of 50 mRNAs were quantified for these 7 sampling points and classified into 4 major cellular pathways.

**Results:** Interestingly, most mRNAs involved in lipid metabolism are overexpressed after hatching (FASN, SCD1, ACOX1), whereas genes implicated in carbohydrate metabolism (HK1, GAPDH, GLUT1) and development (HGF, IGF, FGFR2) are predominantly overexpressed from E12 to E20. Finally, regarding cellular stress, gene expression appears quite stable throughout development, contrasting with strong expression after hatching (CYP2E1, HSBP1, HSP90AA1).

**Conclusion:** For the first time we described the kinetics of hepatic ontogenesis at mRNA level in mule ducks and highlighted different expression patterns depending on the cellular pathway. These results could be particularly useful in the design of embryonic programming for the production of foie gras.

**Keywords:** liver, embryogenesis, transcriptome

## Background

In the context of foie gras production, better knowledge of the establishment of hepatic metabolic pathways during embryogenesis could be of particular interest to modulate the individual response to force-feeding. Indeed embryogenesis is a period of development with high plasticity which can be disturbed by environmental stimuli leading to a

modification of certain physiological responses in adulthood (1,2). Purposefully using this process, called “embryonic programming”, can improve animal performances when a specific challenge is encountered later in life. In mule ducks, we recently demonstrated for the first time that a thermal stimulus over a period covering approximately 50% of the incubation improves the production of foie gras at the age of three months (3). However some negative effects have also been observed (decrease in hatchability, slight decrease in quality of the final product) showing that a better understanding of the metabolism at the embryonic stage in ducks is needed. Therefore, even if duck embryogenesis has been well described in terms of overall morphogenesis (4–6), the specific characterization of hepatic ontogenesis at the metabolic level remains to be explored.

Liver fattening involves the activation of several metabolic pathways. First, hepatocytes must absorb circulating carbohydrates from cornstarch and catabolize glucose (7) to provide substrates for lipid synthesis via the lipogenesis pathway (8,9). These newly formed lipids can then be exported to the general circulation and absorbed by the peripheral tissues (10), or recaptured by the liver, thus amplifying the capacity of this organ to gain fat (11).

Therefore, the aim of the present study was to analyze a wide range of genes involved in liver development, cell stress, lipid and carbohydrate metabolisms throughout embryogenesis in mule ducks to better understand the ontogeny of pathways related to liver fattening.

Since liver sampling was only possible from the 12<sup>th</sup> day of embryogenesis (E12), we analyzed hepatic gene expression at 7 sampling points every 4 days from this point up to

4 days post-hatch (D4) and revealed different patterns of expression depending on the cellular pathway.

Interestingly, carbohydrate-related genes appear to be highly expressed at the start of kinetics, while most lipid-related genes are overexpressed after hatching, revealing greater sensitivity to the food transition that occurs at this stage.

## Results

### Liver development-related gene expression

The relative expressions of genes related to development in the liver are illustrated in figure 1. The heatmap representation (fig. 1.1) clearly divided the profiles into two or even three distinct parts, the peak of expression occurring for most genes between the embryonic day 12 (E12) and the embryonic day 20 (E20) (see statistical summary in supplemental table 1). The lowest expression level appeared mainly on the first day after hatching (D1), before a slight increase observed for most genes on the 4<sup>th</sup> day after hatching (D4). Most of these genes are involved in the processes of cell proliferation (IGF1, FGFR2), differentiation (PROX1, NR5A2) and liver development (GATA6, HGF, PROX1) (see supplemental table 5) and their expression predominantly arose at the beginning of the kinetics.

### Carbohydrate-related gene expression

The second figure depicts the relative expression of carbohydrate-related genes. Again, the weakest expression appeared on D1, as illustrated by the heatmap (figure 2.1), while the mRNA level was significantly higher between E12 and E20 than at the end of kinetics for most genes (supplemental table 2). Nonetheless, compared to development-related genes, the major peak seemed to be tighter around E20. Only the transcription factor ChREBP seemed time-shifted, with a trough at the very beginning of kinetics and a peak

at E28. Genes involved in the transport of glucose (GLUT1, GLUT2) or glycolysis (GAPDH, HK1) were mainly expressed at the beginning of kinetics, the maximal expression occurring at E20 (see statistical summary in supplemental table 6).

#### Lipid-related gene expression

The third figure reveals the expression profiles of lipid-related genes from E12 to D4. As demonstrated by the heatmap (figure 3.1), a clear cut appeared for all gene expressions with a sharp increase on D4 compared to the rest of the kinetics (supplemental table 3), with the exception of DGAT2 and ACSS1 which displayed a profile close to that of the genes related to carbohydrate metabolism.

Most of the genes related to lipid synthesis are weakly expressed at the beginning of the kinetics, with high expression only after birth, such as FASN, SCD1, PPARG, CEPT1 or ACLY (figure 3.2). On the other hand, several genes mainly related to lipid catabolism also show high expression at the beginning of the kinetics, such as ACAD11, CPT1A, ACAA2, or ACAT1 (figure 3.1 and supplemental table 7).

It is noteworthy that the correlation matrix (figure 4) revealed a significant negative link between a group of carbohydrate-related genes and a second group related to lipids. Indeed, ACOX1, SCD1, FASN, LDLR4, ACLY and CEPT1 appeared to be strongly negatively correlated to CREB2/ATF2, DGAT2, GAPDH, GLUT2, GLUT1 and HK1.

#### Stress-related gene expression

The last figure represents the relative expression of stress-related genes. The heatmap (figure 5.1) underlined a peak of expression after birth for most of the genes, particularly on day 4 (figure 5.2 and supplemental table 4). Several of these genes are related to heat

stress (HSP90AA1 or HSBP1) or cellular detoxification (CYP2E1, GSTT1 or GSTK1) (supplemental table 8).

## Discussion

The concept of early programming is based on the high plasticity of organisms during their development, allowing them to adapt their phenotype to environmental conditions. In poultry, it has been shown that embryonic thermal programming improves the survival of animals exposed to subsequent heat stress, and it is particularly interesting to note that the best embryonic period to apply the stimulus corresponds to the maturation period of the hypothalamo-hypophysis-thyroid axis, which is involved in thermal regulation (13). Remarkably, the adapted phenotype may also respond differently to new environmental challenges, such as embryonic thermal manipulation resulting in increased foie gras production in mule ducks at the age of three months (3). Although the mechanisms are not yet fully understood, the timing of the application of the environmental stimulus for programming seems to be very important. In this context, it seems interesting in the field of foie gras production, to study the ontogeny of the metabolic pathways involved in liver fattening, in order to reveal potentially interesting windows of application of the thermal stimulus.

As a first step, the description of gene expression profiles in embryonic duck liver is in itself particularly informative to understand the establishment of hepatic metabolism pathways.

However, since the size of the livers did not allow sampling before E12, it is impossible to conclude on the specifically hepatic expression of developmental genes before this stage.

Data on early chicken embryogenesis suggest that hepatic induction of the anterior endoderm via an interaction with the “cardiac” mesoderm(14) involves many of the

pathways depicted in figure 1 from the very beginning of ontogeny (15,16). Nevertheless, although much of the cell proliferation and hepatic differentiation arise at the earliest stages of liver development (17), our results suggest that these signaling pathways are still strongly involved in ducks between E12 and E20, in morphogenetically distinct livers. Consequently, an environmental stimulus occurring during this period could potentially influence the proliferation and differentiation of hepatocytes, thereby causing a modification in the final number of cells in the mature organ, as previously shown for chicken muscle cells (18,19). Therefore, even though hyperplasia does not seem to be involved in fatty liver enlargement during overfeeding (20), it is conceivable that an increase in the number of hepatocytes at birth may enhance the fattening of the liver during force-feeding, since the ability of each cell to expand (hyperphagia) may not be affected. Moreover, recent studies (3,21) suggest that the histological structure of the liver after overfeeding, particularly the number and size of cells, may play a role in the final quality of the product, mainly indicated by fat loss after cooking. It would therefore be very interesting to determine the precise impact of the embryonic thermal stimulus on the number of hepatic cells at birth and after overfeeding in order to accurately modulate the final yield of fatty liver through a specific programming protocol.

In oviparous animals, the nutrition of the developing embryo depends entirely on the resources from yolk and albumen. Despite the low amount of carbohydrate in the egg (22,23), glycolysis has been described as an extremely important source of energy during the first third of chicken embryogenesis (24) and hatching (25). The present results highlight that expression of carbohydrate-related genes is strongly committed up to E20 in mule duck embryos (figure 2), in particular those related to glucose transport (GLUT1 and 2) and glycolysis (GAPDH and HK1), confirming the major role of the liver in systemic

glucose homeostasis throughout embryogenesis (26,27). Lastly, the drop in carbohydrate-related gene expression observed at D1 might reflect the decline of endogenous resources after hatching, a process involving high energy demand. Since carbohydrate metabolism is a major pathway involved in fattening the liver during overfeeding, the high expression of carbohydrate-related genes around E20 may represent an interesting period for embryonic programming by environmental stimulus. With the exception of ChREBP, the present results suggest that the programming period that may have an impact on carbohydrate metabolism could be centered around E20. Nevertheless, it is still possible that a stimulus applied up to E27 had an impact on the resulting activity of ChREBP. As a major transcription factor playing a key role in carbohydrate and lipid metabolism (28,29), it cannot be excluded that a programming protocol applied during its peak of expression may make an important contribution to the physiological response after overfeeding. Only programming experiments with different stimulus protocols and an in-depth analysis of the impact on ChREBP mRNA and protein expressions, or activity could provide a definitive answer about its specific role and that of other carbohydrate-related genes.

With regard to the lipid metabolism, the significant overall change occurring on the 4<sup>th</sup> day after birth suggests that unlike the genes involved in carbohydrate metabolism, the expression of lipid-related genes could be strongly affected by first meals. Indeed, ducklings sampled on D1 were slaughtered before the first meal, while the ducklings sampled on D4 were all fed ad libitum since day 2. The use of yolk lipids during the development of avian embryos has been well described in a previous review (30). These lipids are the main source of energy during the last week of embryogenesis, when the embryos exhibit an exponential growth (24,31). Therefore, the starting diet, mainly composed of wheat and corn, can be interpreted as a nutritional transition since the

ducklings move from an energy source consisting primarily of lipids from egg yolk to an exogenous diet with high carbohydrate content (32). This crucial transition phase is also accompanied by a major change in the metabolism of the liver that acquires the ability to synthesize its own lipids (33). The present results, like previous studies on chickens (34,35), illustrate this modification of hepatic lipid metabolism by highlighting the sharp increase in the expression of lipogenic genes such as SCD1 (figure 3.2.b) and FASN (figure 3.2.a) at D4 in mule ducklings. These genes are involved in the *de novo* lipogenesis pathway (36,37) which reflects the ability to store carbohydrate sources as lipids (38). In a context of nutritional change with a sudden high intake of carbohydrates, it is consistent to stimulate their storage by increasing the expression of genes involved in lipid synthesis, the liver being the predominant site of lipogenesis in birds (39,40).

However, we observe that the pathway of lipid catabolism is also still engaged at D4, with high expression of ACOX1, ACAD11, CPT1A, ACAA2, suggesting that energy metabolism depends on the use of both carbohydrates and lipid at this stage in mule ducks. Therefore, environmental programming during this critical period could be particularly interesting to study in the context of the response to overfeeding and the production of foie gras. Finally, several genes mainly involved in lipid catabolism (PPARA, CPT1A, ACAA2, ACAT1) also showed high expression at the beginning of the kinetics, between E12 to E20. Indeed, beta-oxidation of fatty acids provides a large part of the energy demand during embryogenesis (30). Consequently, the application of an environmental stimulus during this period could potentially program a different response to force-feeding and thus improve the phenotype.

However, the negative correlation measured between the expression of several carbohydrate and lipid-related genes during embryogenesis suggest that these two

pathways, which seem to work in mirror mode during development (24,30), could be affected differently by early-life programming. Targeting both with a thermal stimulus around E20, where most carbohydrate-related genes and some of the genes related to lipid catabolism are strongly expressed, seems to be the most appropriate choice. Nevertheless, these results also open a new programming window, around the first meals and specific to lipid-related genes, which could be interesting to explore in the context of the production of foie gras.

The overall increase in stress-related gene expressions occurred after the transfer of ducklings from the hatchery to the breeding facility, resulting in a significant temperature change from 37.3°C to 26-28°C. It is interesting to note that a change in the ambient temperature induced a significant increase in the hepatic expression of heat-sensitive genes involved in protein folding (41–43) (supplemental table 8). If the thermal stimulus applied during embryogenesis induced a direct modification of their expression, it might be of interest to use them as positive markers of stimulation. Since the products of these genes are involved in the folding of different types of proteins, a change in their expression profiles could have an impact on several enzymatic activities, even those involved in metabolic processes. To answer this question, an upcoming study will focus on the immediate impact of the thermal change during embryogenesis on the expression level of these genes.

The hatching process represents a major challenge in terms of nutritional regulation, control of body temperature, but also of transition from chorioallantoic to pulmonary respiration (30,35). This abrupt metabolic change with the sudden onset of elevated oxygen levels may result in an increase in oxidative stress that must be controlled to maintain overall cellular homeostasis. The enhanced expression of several genes involved

in cellular detoxification such as GSTK1 (44), GSTT1 (45) or CYP2E1 (46) in the liver of newborn ducklings may be a reflection of this control system. Finally, these expression patterns confirm that hatching is certainly the most brutal challenge a bird faces throughout its life and suggest that embryonic thermal stimulus could be specifically traced by some of these stress-related biological markers.

## **Conclusion**

These results highlight a wide range of gene expressions during liver ontogenesis in mule ducks and describe for the first time the embryonic establishment of carbohydrate and lipid metabolisms. In the context of foie gras production, the identification of these embryonic expression profiles could be of interest in order to design new programming protocols.

## **Methods**

### Number of animals and method of euthanasia

In accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010, all the animals were slaughtered by decapitation (as birds weighting less than 250g), and the number of animals was reduced to the maximum by setting the power of the test at 80% and the alpha risk at 5% using a bilateral test. From previous studies of gene expression, we expected a coefficient of variability around 50%, and wanted an inter group variation of 50%. These parameters lead us to calculate  $n=16$  animals per group. Given the fertility and hatchability rates (estimated at 90% and 80% respectively), we chose to incubate 160 eggs (to assure 7 sample points of 16 individuals), and we were finally able to sample 20 individuals per group.

### Animal and sample collections

A total of 160 mule duck eggs, from mothers aged 46 weeks (genotype H85, provided by Grimaud Frères Selection Company, Roussay, France), were kept at room temperature during 3 days, prior to incubation at 37.6°C, and 60% average relative humidity (RH) during the whole incubation period. All eggs were turned through 90° every 3 hours. Temperature and hygrometry were continuously measured by a sensor (KIMO). Unfertilized eggs were excluded by candling at E10, with a sliding of remaining eggs to prevent local temperature disturbances caused by the appearance of holes. At E27, all eggs were placed in the same hatcher at 37.3°C and 80% RH. On day 2, the ducklings were transferred to a rearing room where the ambient temperature was adjusted to 26-28°C and the starting diet (PALMA07, Maïsador, France) was available *ad libitum*. Livers from 20 randomly selected animals were sampled every 4 days from 12<sup>th</sup> embryonic day (E12) to the 4<sup>th</sup> day after birth (D4).

Samples were frozen in liquid nitrogen for RNA analysis. 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 with Take3 Plate, and all the samples were normalized at 500 ng/ µl. The integrity of total RNA was analyzed by electrophoresis. An amount of 3µg RNA was reverse-transcribed to cDNA with Iscript Reverse Transcription Supermix for RTqPCR (Bio-Rad, USA) with duplicates of samples. DNA contamination was prevented by DNase treatment. Reverse transcription reaction was done in CFX384 (Bio-Rad, USA) according to this program: 25 °C/5 min, 46 °C/20 min, 95 °C/1 min.

#### qPCR EvaGreen using BioMark

The mRNA levels of 50 genes coding for proteins involved in lipid metabolism, carbohydrate metabolism, stress and development were quantified. The primer sequences

(listed in supplemental tables 5 to 8) used in the qPCR assays were created first by aligning the protein sequences of humans, mice and ducks (*Anas platyrhynchos*) on MultAlin (47) to identify the best-preserved exon. These exons were then treated on Primer3 (48,49) to build specific primers. Validation of their efficiency ranging from 1.90 to 2 was performed using cascade dilution of a pool of cDNA, and their specificity was confirmed by sequencing the amplicon. High throughput real-time quantitative PCR was performed using the Biomark microfluidic system from Fluidigm (GeT-PlaGe platform, Castanet-Tolosan, France) in which every sample-gene combination is quantified using a 96.96 Dynamic Array™ IFCs (BMK-M-96.96, Fluidigm,). Pre-amplification of the samples, chip loading and real time quantitative PCR were performed according to manufacturer's protocol. Real time quantitative PCR results were analyzed using the Fluidigm real-time PCR analysis software v.4.1.3.

Firstly, 6.5 ng of each cDNA were initially preamplified (10 min 95°C activation and 14 PCR cycles (15 sec 95°C and 4 min 60°C) with PreAmp Master Mix (100-5581, Fluidigm) and a pool containing all the primers targeting all the genes (200nM), excluding the 16S rRNA primer sets. Preamplified sample were diluted at 1/5 after an exonuclease treatment (M02935, NEB). In order to prepare samples for loading into the integrated fluidic circuits (IFC), a mix was prepared consisting of 440 µL 2X TaqMan Master Mix (Applied Biosystem, 4369016), 44 µL 20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (100-7609, Fluidigm), 44µl 20X Evagreen (31000, Biotium) plus 132 µL TE, and 6 µL of this mix was dispensed to each well of a 96-well assay plate. 2µL of preamplified and diluted cDNA sample was added to each well and the plate was briefly vortexed and centrifuged. For the assays, 5 µL of each Assay (5 µM each primer in primer-mix (2X assay loading reagent (100-7611, Fluidigm) and Tris EDTA) were dispensed to each Detector Inlet of the 96.96 IFC.

Following priming of the IFC in the IFC Controller HX, 5  $\mu$ L of the cDNA sample + reagent mix and 5  $\mu$ l of Assay were dispensed to each Sample Inlet of the 96.96 IFC. After loading the assays and samples into the IFC in the IFC Controller HX, the IFC was transferred to the BioMark and PCR was performed using the following thermal protocol : Thermal Mix of 50 °C, 2 min; 70 °C, 30min; 25°C, 10min, Hot Start at 50 °C, 2 min; 95°C, 10 min, PCR Cycle of 35 cycles of (95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s), and Melting analysis (60°C, 30s; 95°C,1°C/3s). Results were analyzed using the Fluidigm real-time PCR analysis software v.4.1.3.

#### Data pre-processing

The first part of the analysis is to clean up the data with the Fluidigm real-time PCR analysis software v.4.1.3. Data were pre-processed for expression analysis as follows: the cycle threshold (Ct) values registered from amplifications that generated melting curves with aberrant T<sub>m</sub> (melting temperature) or with products giving rise to a double peak in melting curves (corresponding to a mixture of expected and aberrant PCR products) were removed.

#### Gene expression analysis

The selectHKgenes function with the "Vandesompele" method of the SLqPCR package was used with RStudio (Version 1.2.1335) to choose the five most stable housekeeping genes. The five housekeeping genes for the relative quantification of mRNA levels of target genes were SDHA, GLUT8, PDHA1, POL2 and Luciferase. Luciferase is an exogenous RNA (Promega), added to each sample during the reverse transcription (100 pg per inch) to allow normalization of the data, as previously described (50,51). 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 1.90 and 2. The analyses were done with RStudio (52,53) with:

$$\text{Relative gene expression} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{target}}}}{\text{geomean}((E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{ref}}})}$$

$$\text{Relative gene expression} = \frac{2^{\Delta\text{Ct}_{\text{target}}}}{(2^{\Delta\text{Ct}_{\text{SDHA}}} \times 2^{\Delta\text{Ct}_{\text{GLUT8}}} \times 2^{\Delta\text{Ct}_{\text{PDHA1}}} \times 2^{\Delta\text{Ct}_{\text{POL2}}} \times 2^{\Delta\text{Ct}_{\text{luciferase}}})^{\frac{1}{5}}}$$

Ct= threshold cycle

$$\Delta\text{Ct}_{\text{target}} = \text{Ct}_{\text{control}} - \text{Ct}_{\text{sample}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{ref}} = \text{Ct}_{\text{control}} - \text{Ct}_{\text{sample}}$$

Ct<sub>control</sub> = average Ct of all samples

### Statistical analysis

Statistical analyses were done using the Graphpad Prism version 8 for Windows (GraphPad software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) (serial number GP8-1598457-RJQD-5E2EC)). Data are presented with a box-and-whisker plot, boxes ranging from the 25th to the 75th percentiles, and whiskers ranging from the lowest to the highest value. When the data set presented a Normal distribution (assessed by Shapiro–Wilk test), parametric variance analysis (ANOVA) was performed followed by a Bonferroni's multiple comparison test as post hoc analysis. When normal distribution was not demonstrated, the Kruskal–Wallis non-parametric test was performed followed by a Dunn's test as post hoc analysis. In every case, differences between the groups were considered statistically significant if the value of  $P < 0.05$ .

The heatmap.2 function from the gplots package was used to draw heatmaps with RStudio. The **corrplot** package was used to draw the correlation matrix; this package contains algorithms to reorder the matrix according to the degree of correlation between the variables.

### List of abbreviations

ANOVA: analysis of variance; Ct: cycle threshold; D4: day 4 after hatching; E12: embryonic day 12; PCR: polymerase chain reaction; Tm: melting temperature.

All gene symbols are listed in the supplemental figures.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

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 APAFIS14196-201805250850236-v3. The present study was carried out in the certified Experimental Station for Waterfowl Breeding (INRA, Artiguères, France, which received the accreditation number B40-037-1.

### References

1. Barker DJP, Medical Research Council (Great Britain), Environmental Epidemiology Unit. Fetal and infant origins of adult disease: papers written by the Medical Research Council Environmental Epidemiology Unit, University of Southampton. London: British Medical Journal; 1993.
2. Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. J Nutr. févr 1998;128(2 Suppl):401S-406S.
3. Massimino W, Davail S, Bernadet M-D, Pioche T, Tavernier A, Ricaud K, et al. Positive Impact of Thermal Manipulation During Embryogenesis on Foie Gras Production in Mule Ducks.

- Frontiers in Physiology [Internet]. 12 déc 2019 [cité 13 déc 2019];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.01495/full>
4. Sellier N, Brillard J-P, Dupuy V, Bakst MR. Comparative Staging of Embryo Development in Chicken, Turkey, Duck, Goose, Guinea Fowl, and Japanese Quail Assessed from Five Hours After Fertilization Through Seventy-Two Hours of Incubation. *Journal of Applied Poultry Research*. juill 2006;15(2):219-28.
  5. Lumsangkul C, Fan Y-K, Chang S-C, Ju J-C, Chiang H-I. Characterizing early embryonic development of Brown Tsaiya Ducks (*Anas platyrhynchos*) in comparison with Taiwan Country Chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Yildirim A, éditeur. PLOS ONE*. 9 mai 2018;13(5):e0196973.
  6. Li S, Bai S, Qin X, Zhang J, Irwin DM, Zhang S, et al. Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*). *Poultry Science*. août 2019;98(8):3278-91.
  7. Annabelle T, Karine R, Marie-Dominique B, Stéphane D, Karine G. Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry*. juin 2017;430(1-2):127-37.
  8. Hérault F, Saez G, Robert E, Al Mohammad A, Davail S, Chartrin P, et al. Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim Genet*. févr 2010;41(1):12-20.
  9. Annabelle T, Karine R, Marie-Dominique B, Karine G, Stéphane D. Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry*. janv 2018;438(1-2):111-21.
  10. Saez G, Baéza E, Bernadet MD, Davail S. Is there a relationship between the kinetics of lipoprotein lipase activity after a meal and the susceptibility to hepatic steatosis development in ducks? *Poultry Science*. nov 2010;89(11):2453-60.
  11. 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. *Molecular and Cellular Biochemistry*. janv 2017;424(1-2):147-61.
  12. Piestun Y, Shinder D, Ruzal M, Halevy O, Brake J, Yahav S. Thermal Manipulations During Broiler Embryogenesis: Effect on the Acquisition of Thermotolerance. *Poultry Science*. 1 août 2008;87(8):1516-25.
  13. 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. *Journal of Applied Physiology*. 30 oct 2008;106(1):233-40.
  14. Fukuda-Taira S. Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol*. juin 1981;63:111-25.
  15. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*. 18 juin 1999;284(5422):1998-2003.

16. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nature Reviews Genetics*. juill 2002;3(7):499-512.
17. Suksaweang S, Lin C-M, Jiang T-X, Hughes MW, Widelitz RB, Chuong C-M. Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. *Dev Biol*. 1 févr 2004;266(1):109-22.
18. Halevy O, Krispin A, Leshem Y, McMurtry JP, Yahav S. Early-age heat exposure affects skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation in chicks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. juill 2001;281(1):R302-309.
19. Piestun Y, Halevy O, Shinder D, Ruzal M, Druyan S, Yahav S. Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. *Journal of Thermal Biology*. oct 2011;36(7):469-74.
20. BENARD G, BENGONE T, PREHN D, DURAND S, LABIE C, BENARD P. Contribution à l'étude de la physiologie du canard en gavage: étude de la stéatose hépatique. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 2006;
21. 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*. déc 2011;89(4):377-83.
22. Thommes RC, Just JJ. ENDOCRINE CONTROL OF YOLK SAC MEMBRANE GLYCOGEN LEVELS IN THE DEVELOPING CHICK EMBRYO. I. GLUCAGON. *Gen Comp Endocrinol*. déc 1964;4:614-23.
23. Yadgary L, Cahaner A, Kedar O, Uni Z. Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. *Poultry Science*. 1 nov 2010;89(11):2441-52.
24. Moran ET. Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poult Sci*. mai 2007;86(5):1043-9.
25. Freeman BM. The mobilization of hepatic glycogen in *Gallus domesticus* at the end of incubation. *Comp Biochem Physiol*. mars 1969;28(3):1169-76.
26. Ballard FJ, Oliver IT. Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 4 juin 1963;71:578-88.
27. Yadgary L, Uni Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. *Poultry Science*. 1 févr 2012;91(2):444-53.
28. Wang Y, Viscarra J, Kim S-J, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. nov 2015;16(11):678-89.
29. Ortega-Prieto P, Postic C. Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 4 juin 2019 [cité 10 sept 2019];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00472/full>
30. Speake BK, Murray AM, Noble RC. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog Lipid Res*. mai 1998;37(1):1-32.

31. Noble RC, Cocchi M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Prog Lipid Res.* 1990;29(2):107-40.
32. Noy Y, Sklan D. Energy utilization in newly hatched chicks. *Poult Sci.* déc 1999;78(12):1750-6.
33. Noble RC, Ogunyemi D. Lipid changes in the residual yolk and liver of the chick immediately after hatching. *Biol Neonate.* 1989;56(4):228-36.
34. Richards MP, Proszkowiec-Weglarz M, Rosebrough RW, McMurtry JP, Angel R. Effects of early neonatal development and delayed feeding immediately post-hatch on the hepatic lipogenic program in broiler chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* déc 2010;157(4):374-88.
35. Cogburn LA, Trakooljul N, Chen C, Huang H, Wu CH, Carré W, et al. Transcriptional profiling of liver during the critical embryo-to-hatchling transition period in the chicken (*Gallus gallus*). *BMC Genomics* [Internet]. déc 2018 [cité 10 sept 2019];19(1). Disponible sur: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-5080-4>
36. Clarke SD. Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation. *J Anim Sci.* juill 1993;71(7):1957-65.
37. ALJohani AM, Syed DN, Ntambi JM. Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* déc 2017;28(12):831-42.
38. Sanders FWB, Griffin JL. *De novo* lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose: Hepatic *de novo* lipogenesis and metabolic disease. *Biological Reviews.* mai 2016;91(2):452-68.
39. 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.* juill 1975;54(4):1075-93.
40. Ding F, Pan Z, Kou J, Li L, Xia L, Hu S, et al. *De novo* lipogenesis in the liver and adipose tissues of ducks during early growth stages after hatching. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* sept 2012;163(1):154-60.
41. Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A. The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. *Genomics.* déc 2005;86(6):627-37.
42. Shi Z, Zhang J, Zheng S. What we know about ST13, a co-factor of heat shock protein, or a tumor suppressor? *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* mars 2007;8(3):170-6.
43. Baaklini I, Wong MJH, Hantouche C, Patel Y, Shrier A, Young JC. The DNAJA2 Substrate Release Mechanism Is Essential for Chaperone-mediated Folding. *Journal of Biological Chemistry.* 7 déc 2012;287(50):41939-54.
44. Guo ZK, Cella LK, Baum C, Ravussin E, Schoeller DA. *De novo* lipogenesis in adipose tissue of lean and obese women: application of deuterated water and isotope ratio mass spectrometry. *Int J Obes Relat Metab Disord.* juill 2000;24(7):932-7.
45. Whalen R, Boyer TD. Human glutathione S-transferases. In: *Seminars in liver disease.* © 1998 by Thieme Medical Publishers, Inc.; 1998. p. 345-58.

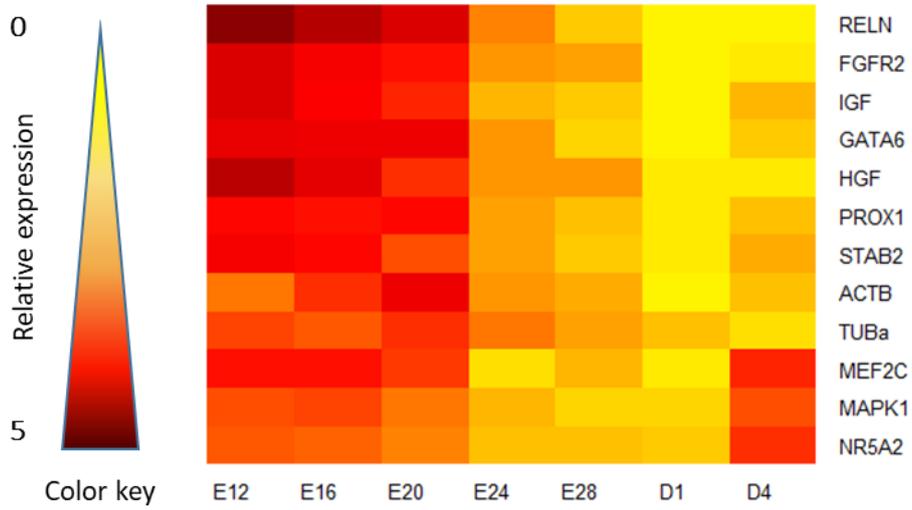
46. Leung T-M, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2013;58(2):395-8.
47. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*. 1988;16(22):10881-10890.
48. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 15 mai 2007;23(10):1289-91.
49. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. août 2012;40(15):e115-e115.
50. Desvignes T, Fauvel C, Bobe J. The nme gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. oct 2011;384(4-5):439-49.
51. Marandel L, Labbe C, Bobe J, Le Bail P-Y. Evolutionary history of c-myc in teleosts and characterization of the duplicated c-myca genes in goldfish embryos. *Molecular Reproduction and Development*. févr 2012;79(2):85-96.
52. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. déc 2001;25(4):402-8.
53. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*. 2004;26(6):509-15.

## Figures and legends

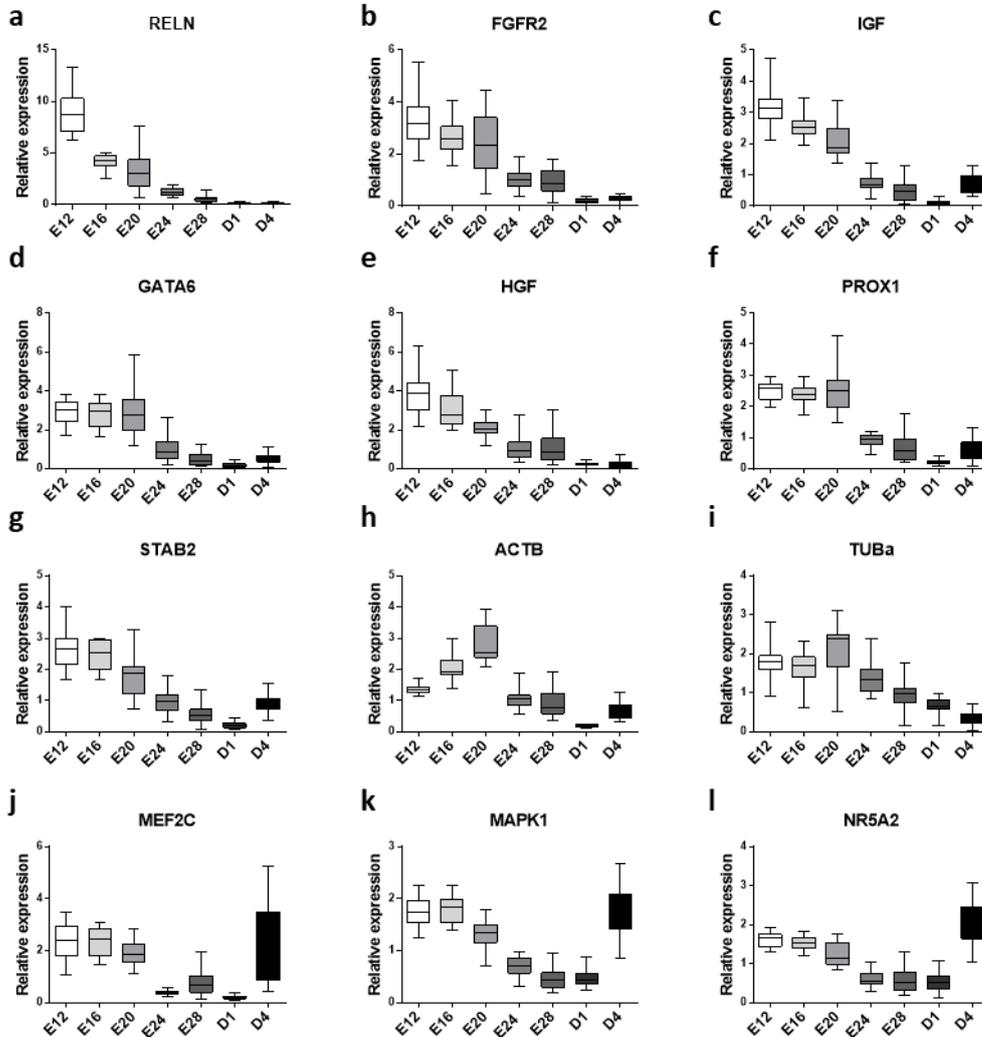
### **Figure 1. Relative hepatic expression of development-related genes from E12 to D4**

1. Heatmap illustration of liver gene expressions at different stages in mule ducks. Low gene expression is indicated in yellow, while high expression is in red, according to the color key.
2. Box-and-whisker plots representations of expression profile of RELN (a), FGFR2 (b), IGF (c), GATA6 (d), HGF (e), PROX1 (f), STAB2 (g), ACTB (h), TUBa (j), MEF2C (j), MAPK1 (k), NR5A2 (l) in the liver of mule duck during development. The boxes extend from the 25th to the 75th percentiles, and the whiskers range from the lowest value to the highest.

1.



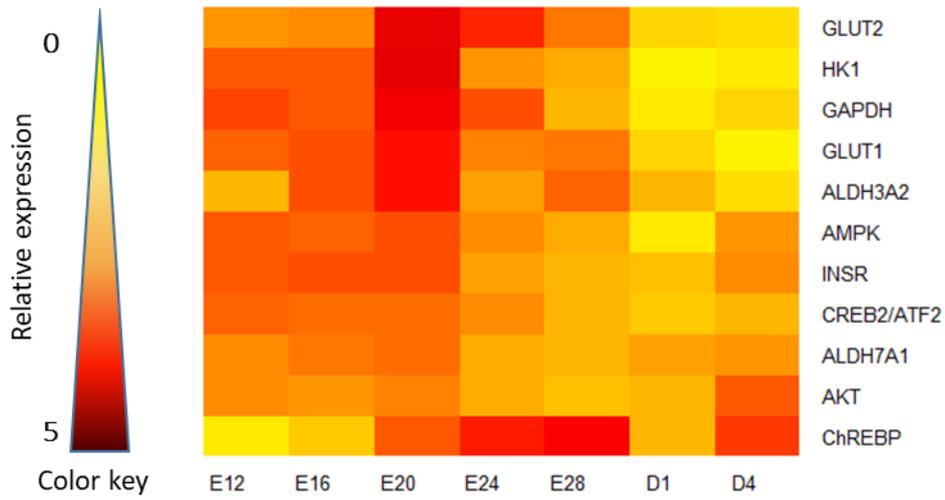
2.



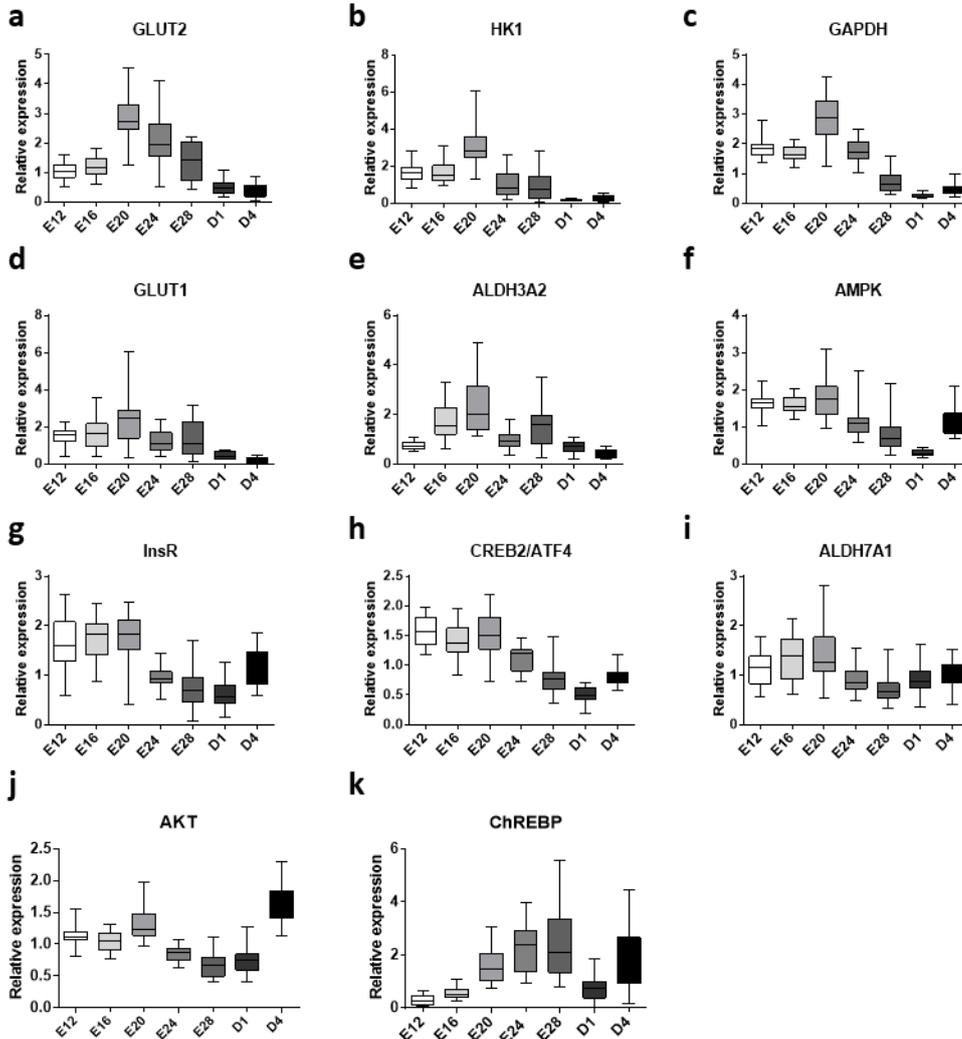
**Figure 2. Relative hepatic expression of carbohydrate-related genes from E12 to D4**

1. Heatmap illustration of liver gene expressions at different stages in mule ducks. Low gene expression is indicated in yellow, while high expression is in red, according to the color key.
2. Box-and-whisker plots representation of expression profile of GLUT2 (a), HK1 (b), GAPDH (c), GLUT1 (d), ALDH3A2 (e), AMPK (f), INSR (g), CREB2/ATF2 (h), ALDHA7 (i), AKT (j), ChREBP (k) in the liver of mule duck during development. The boxes extend from the 25th to the 75th percentiles, and the whiskers range from the lowest value to the highest.

1.

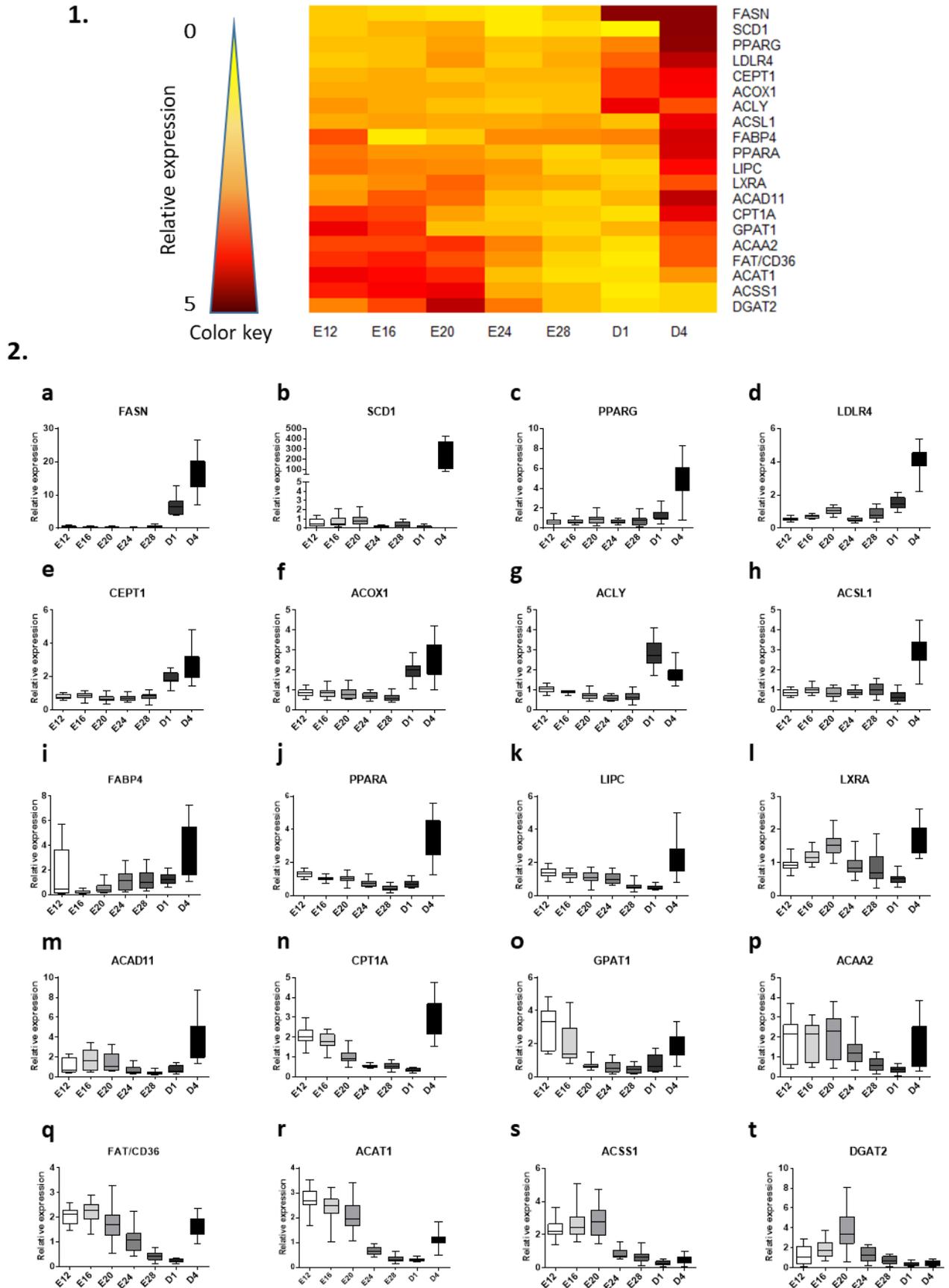


2.



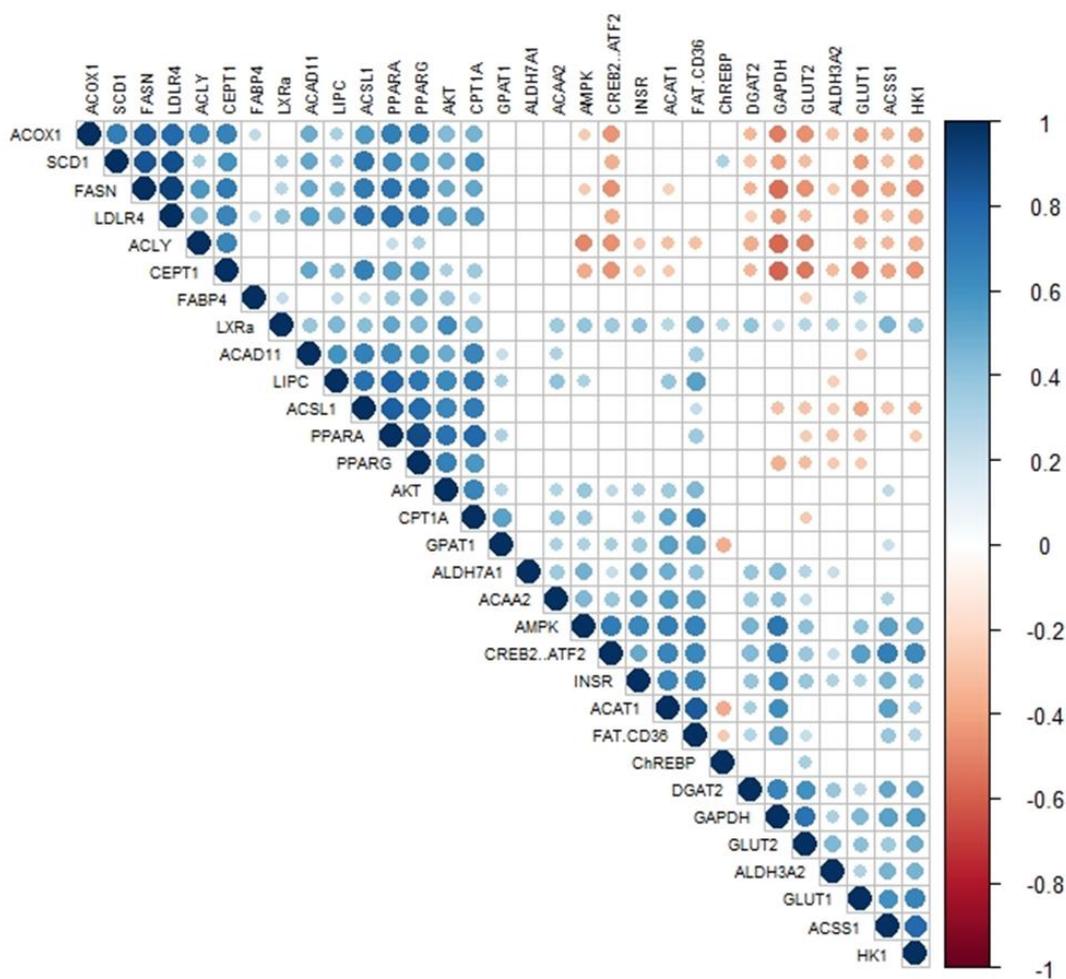
**Figure 3. Relative hepatic expression of lipid-related genes from E12 to D4**

1. Heatmap illustration of liver gene expressions at different stages in mule ducks. Low gene expression is indicated in yellow, while high expression is in red, according to the color key.
2. Box-and-whisker plots representations of expression profile of FASN (a), SCD1 (b), PPARG (c), LDLR4 (d), CEPT1 (e), ACOX1 (f), ACLY (g), ACSL1 (h), FABP4 (j), PPARA (j), LIPC (k), LXRA (l), ACAD11 (m), CPT1A (n), GPAT1 (o), ACAA2 (p), FAT/CD36 (q), ACAT1 (r), ACSS1 (s), DGAT2 (t) in the liver of mule duck during development. The boxes extend from the 25th to the 75th percentiles, and the whiskers range from the lowest value to the highest.



**Figure 4. Correlation matrix of lipid and carbohydrate gene expressions**

This color-coded correlation matrix illustrates the pairwise correlations between levels of gene expression throughout the kinetics (Pearson method, the presence of colored dot means  $p > 0.01$ ). The color scale on the right indicates the strengths of the correlations (blue for positive correlation, red for negative correlation).

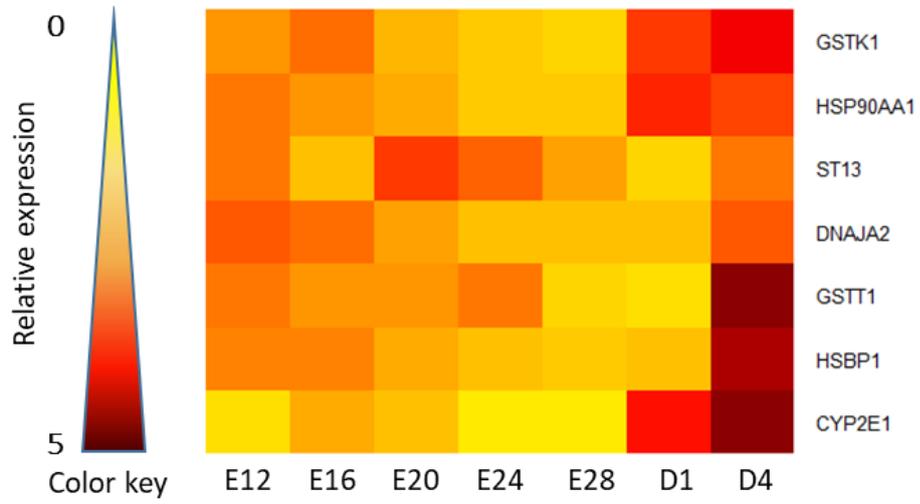


**Figure 5. Relative hepatic expression of stress-related genes from E12 to D4**

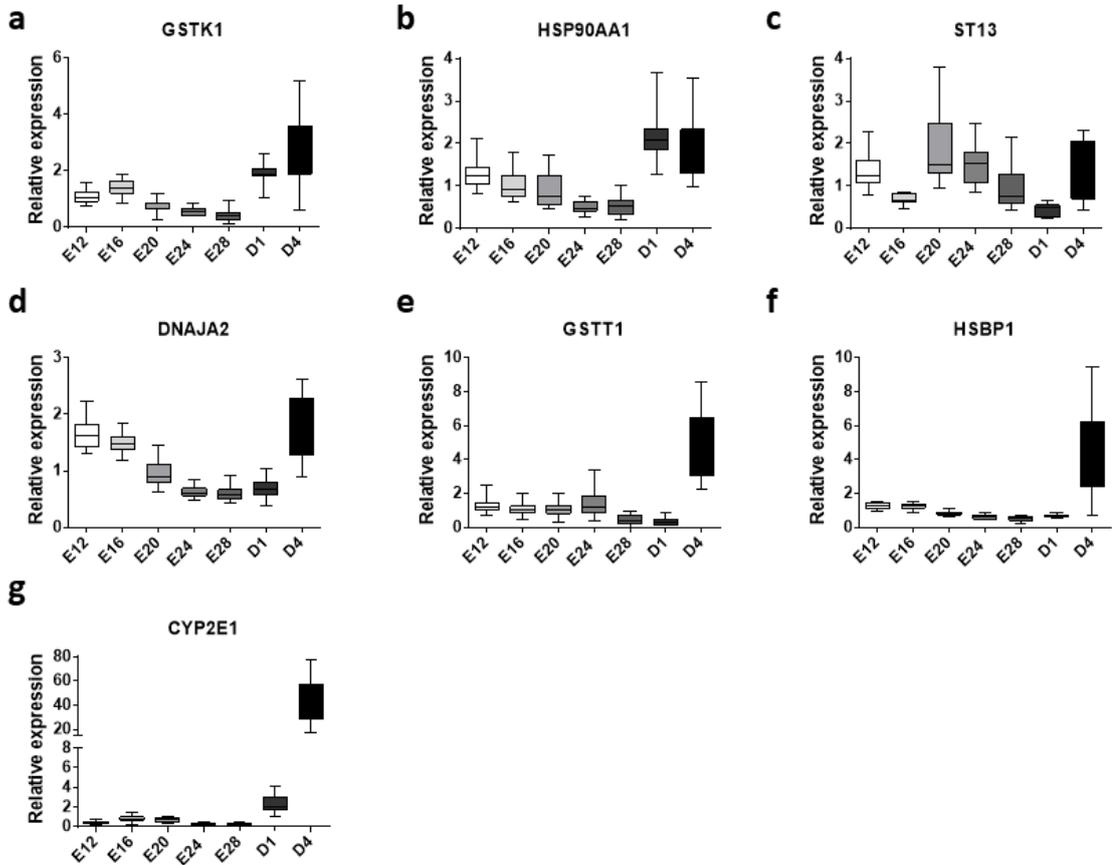
1. Heatmap illustration of liver gene expressions at different stages in mule ducks. Low gene expression is indicated in yellow, while high expression is in red, according to the color key.

2. Box-and-whisker plots representations of expression profile of GSTK1 (a), HSP90AA1 (b), ST13 (c), DNAJA2 (d), GSTT1 (e), HSBP1 (f), CYP2E1 (g) in the liver of mule duck during development. The boxes extend from the 25th to the 75th percentiles, and the whiskers range from the lowest value to the highest.

1.



2.



**Supplemental figures**

**Supplemental Table 1. Statistical summary of developmental gene expression**

**comparisons over time from E12 to D4**

Statistical comparisons over time (E12 to D4) of the gene expressions illustrated in figure 1.

Depending on shapiro test result, ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis (K-W) with Dunn's multiple comparisons test were used (n=14-20).

ns: not significant, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

Group Comparison	Statistical results - development-related genes											
	RELN	FGFR2	IGF	GATA6	HGF	PROX1	STAB2	ACTB	TUBa	MEF2C	MAPK1	NR5A2
E12 vs. E16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E12 vs. E20	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****	ns
E12 vs. E24	***	***	****	****	****	**	***	ns	ns	****	****	****
E12 vs. E28	****	****	****	****	****	****	****	ns	**	***	****	****
E12 vs. D1	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
E12 vs. D4	****	****	****	****	****	****	****	*	****	ns	ns	ns
E16 vs. E20	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****	ns
E16 vs. E24	ns	*	***	****	**	*	***	**	ns	****	****	****
E16 vs. E28	**	**	****	****	**	****	****	***	*	***	****	****
E16 vs. D1	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
E16 vs. D4	****	****	***	****	****	****	***	****	****	ns	ns	ns
E20 vs. E24	ns	ns	*	****	ns	**	ns	****	ns	***	****	*
E20 vs. E28	*	*	***	****	ns	****	**	****	***	*	****	*
E20 vs. D1	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	**
E20 vs. D4	****	****	*	****	****	****	ns	****	****	ns	****	*
E24 vs. E28	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E24 vs. D1	**	*	ns	*	ns	*	*	***	*	ns	ns	ns
E24 vs. D4	**	ns	****	***	****	****						
E28 vs. D1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
E28 vs. D4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	****	****
D1 vs. D4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	****	****	****
n	18-20	14-20	14-20	14-20	16-20	16-20	17-20	16-20	19-20	17-20	17-20	17-20
Statistical test	K-W	K-W	K-W	ANOVA	K-W	K-W	K-W	K-W	K-W	K-W	ANOVA	K-W

**Supplemental Table 2. Statistical summary of carbohydrate-related gene expression comparisons over time from E12 to D4**

Statistical comparisons over time (E12 to D4) of the gene expressions illustrated in figure 2.

Depending on shapiro test result, ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis (K-W) with Dunn's multiple comparisons test were used (n=7-20).

ns: not significant, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

Group Comparison	Statistical results - Carbohydrate-related genes										
	GLUT2	HK1	GAPDH	GLUT1	ALDH3A2	AMPK	INSR	CREB2/ATF2	ALDH7A1	AKT	ChREBP
E12 vs. E16	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E12 vs. E20	****	ns	ns	ns	****	ns	ns	ns	ns	ns	***
E12 vs. E24	****	ns	ns	ns	ns	*	****	****	ns	**	****
E12 vs. E28	ns	ns	**	ns	ns	****	****	****	*	****	****
E12 vs. D1	*	***	****	*	ns	****	****	****	ns	****	ns
E12 vs. D4	**	****	****	****	ns	*	*	****	ns	****	****
E16 vs. E20	****	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**
E16 vs. E24	****	ns	ns	ns	ns	*	****	*	**	ns	****
E16 vs. E28	ns	ns	*	ns	ns	****	****	****	****	****	****
E16 vs. D1	**	***	****	**	***	****	****	****	*	***	ns
E16 vs. D4	***	****	***	****	****	*	***	****	ns	****	****
E20 vs. E24	**	***	ns	ns	**	**	****	***	**	****	ns
E20 vs. E28	****	****	****	ns	ns	****	****	****	****	****	*
E20 vs. D1	****	****	****	****	****	****	****	****	**	****	ns
E20 vs. D4	****	****	****	****	****	**	***	****	*	****	ns
E24 vs. E28	***	ns	**	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
E24 vs. D1	****	ns	****	ns	ns	**	ns	****	ns	ns	****
E24 vs. D4	****	ns	***	**	**	ns	ns	**	ns	****	ns
E28 vs. D1	****	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	****
E28 vs. D4	****	ns	ns	***	****	ns	*	ns	ns	****	ns
D1 vs. D4	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	*	ns	****	***
n	19-20	juil-19	18-20	sept-20	16-20	18-20	17-20	19-20	18-20	18-20	17-20
Statistical test	ANOVA	K-W	K-W	K-W	K-W	K-W	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA

**Supplemental Table 3. Statistical summary of lipid-related gene expression comparisons over time from E12 to D4**

Statistical comparisons over time (E12 to D4) of the gene expressions illustrated in figure 3.

Depending on shapiro test result, ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis (K-W) with Dunn's multiple comparisons test were used (n=10-20).

ns: not significant, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

Group Comparison	Statistical results - Lipid-related genes																			
	FASN	SCD1	PPARG	LDLR4	CEPT1	ACOX1	ACLY	ACSL1	FABP4	PPARA	LIPC	LXRa	ACAD11	CPT1A	GPAT1	ACAA2	FAT/CD36	ACAT1	ACSS1	DGAT2
E12 vs. E16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E12 vs. E20	ns	ns	ns	***	ns	**	ns	****	****	ns	ns	***	ns	****						
E12 vs. E24	****	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	***	ns	ns	****	****	ns	****	****	*	ns	ns
E12 vs. E28	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	****	****	ns	ns	****	****	*	****	****	***	ns
E12 vs. D1	ns	ns	ns	****	****	**	****	ns	ns	***	****	ns	ns	****	****	****	****	****	****	ns
E12 vs. D4	***	****	****	****	****	***	****	****	**	ns	ns	***	***	****	ns	ns	*	****	****	ns
E16 vs. E20	ns	ns	ns	*	ns	****	**	ns	*	ns	ns	****								
E16 vs. E24	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	****	****	ns	****	****	**	ns
E16 vs. E28	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	****	***	ns	****	****	****	**	****	****	****	**
E16 vs. D1	**	ns	ns	****	**	***	****	*	***	ns	****	****	ns	****	**	****	****	****	****	***
E16 vs. D4	****	***	****	****	****	****	****	****	****	**	ns	ns	ns	****	ns	ns	***	****	****	***
E20 vs. E24	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	****	****	**	****						
E20 vs. E28	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****	**	****	***	ns	ns	**	****	****	****	****
E20 vs. D1	****	*	ns	**	****	****	****	ns	ns	ns	***	****	ns	***	ns	****	****	****	****	****
E20 vs. D4	****	**	****	****	****	****	****	****	****	***	*	ns	ns	****	**	ns	ns	****	****	****
E24 vs. E28	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****	ns	ns	ns
E24 vs. D1	****	ns	ns	****	****	****	****	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	****	ns	*	ns
E24 vs. D4	****	****	****	****	****	****	****	****	*	****	**	****	****	****	****	ns	**	*	ns	ns
E28 vs. D1	*	ns	ns	****	***	****	****	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E28 vs. D4	****	****	****	****	****	****	****	****	ns	****	****	****	****	****	****	ns	****	****	ns	ns
D1 vs. D4	ns	****	****	****	ns	ns	****	****	ns	****	****	****	****	****	**	***	****	****	ns	ns
n	16-20	oct-20	18-19	18-20	19-20	18-20	17-20	19-20	15-19	18-20	19-20	17-20	17-20	16-20	15-20	19-20	18-20	18-20	16-20	14-20
Statistical test	K-W	K-W	ANOVA	ANOVA	K-W	K-W	ANOVA	ANOVA	K-W	K-W	K-W	K-W	K-W	ANOVA	K-W	K-W	ANOVA	ANOVA	K-W	ANOVA

**Supplemental Table 4. Statistical summary of stress-related gene expression comparisons over time from E12 to D4**

Statistical comparisons over time (E12 to D4) of the gene expressions illustrated in figure 4.

Depending on shapiro test result, ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis (K-W) with Dunn's multiple comparisons test were used (n=16-20).

ns: not significant, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

Group Comparison	Statistical results - Stress-related genes						
	GSTK1	HSP90AA1	ST13	DNAJA2	GSTT1	HSBP1	CYP2E1
E12 vs. E16	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
E12 vs. E20	ns	ns	ns	****	ns	ns	ns
E12 vs. E24	*	****	ns	****	ns	****	ns
E12 vs. E28	**	****	ns	****	***	****	ns
E12 vs. D1	*	ns	****	****	****	***	ns
E12 vs. D4	**	ns	ns	ns	*	ns	****
E16 vs. E20	*	ns	****	****	ns	ns	ns
E16 vs. E24	***	*	***	****	ns	****	ns
E16 vs. E28	****	*	ns	****	*	****	ns
E16 vs. D1	ns	**	ns	****	**	***	ns
E16 vs. D4	ns	ns	*	ns	***	ns	****
E20 vs. E24	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
E20 vs. E28	ns	ns	**	**	*	*	ns
E20 vs. D1	****	****	****	ns	**	ns	ns
E20 vs. D4	****	**	ns	****	***	****	****
E24 vs. E28	ns	ns	*	ns	**	ns	ns
E24 vs. D1	****	****	****	ns	***	ns	ns
E24 vs. D4	****	****	ns	****	**	****	****
E28 vs. D1	****	****	*	ns	ns	ns	ns
E28 vs. D4	****	****	ns	****	****	****	****
D1 vs. D4	ns	ns	****	****	****	****	****
n	19-20	18-20	17-20	17-20	17-20	19-20	16-20
Statistical test	K-W	K-W	K-W	ANOVA	K-W	K-W	ANOVA

**Supplemental Table 5**

Informative table on primers used for the study of development-related genes.

Development-related genes			
Gene name	Gene Symbol	main function	Primer sequence
actin beta	ACTB	Cell growth, motility, structure	CCAGCCATCTTTCTTGGGTA ATGCCTGGGTACATTGTGGT
Fibroblast growth factor Receptor 2	FGFR2	Hepatic diferenciacion, proliferation	CGCAGGATGGTCCACTCTAT CCAGCTGGTAAGTGCAGGAT
GATA binding protein 6	GATA6	Liver bud expansion and differentiation	TCAAAGGCATGCTCTGGTAA CTGTGTACAGCCCGTCTGA
Hepatocyte growth factor	HGF	Antiapoptotic function in hepatocytes, liver development, hepatotrophy	GAGCACAGCTTTTTGCCTTC CCTTCCCTGACTCGGTATGA
Insulin-like growth factor 1	IGF1	Proliferation, differentiation, metabolism (liver)	TACCAAGGCATGACCAATGA AGACCTCTTTGAACGCTGGA
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Cells proliferation and differentiation, insulin signal	ACTCAACACCTCAGCAACGA CCTGTGTATCATGGTCTGG
Myocyte enhancer factor 2C	MEF2C	Regulation of hepatic stellate cell activation	CTGGCAACAGCAACACCTAC GGTGTGGTGGTACGGTCTCT
Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 (or liver receptor homolog-1)	NR5A2	Hepatic progenitor development, differentiation and metabolism	TTAGAAGCTGTGCGAGCTGA TCTGTAGGAGGCAAGGCAGT
Prospero homeobox 1	PROX1	Hepatic progenitors migration, hepatoblast differentiation	CCGCAGAAGGTCTCTCTTTG CTTGGGTACCGGGTGTAAAA
Reelin	RELN	Extracellular matrix protein involved in the control of cell-cell interaction, hepatic tissue repair	TTAGTGCCCTTCCAATGTC CAGCTGTGCTTCACTGTTGC
Stabilin 2	STAB2	Endothelial cells maturation	ACCTATCAACCCATGCTCCA TGCACTCACAGTGGGACTTT
Tubulin alpha	TUBa	Cell architecture, intracelllular transport, modulation of surface receptor, cell motility and differentiation	ATGCCAAGCGACAAAACCAT AGTGAATGACCTCGAGCGT

**Supplemental Table 6**

Informative table on primers used for the study of carbohydrate-related genes.

<b>Carbohydrate-related genes</b>			
<b>Gene name</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>main function</b>	<b>Primer sequence</b>
AKT serine/threonine kinase 1	AKT	glucose signaling	GGGAAGAATGGACGAAAGCC AGTGCCTTTTCCAGTAGCT
Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2	ALDH3A2	oxidation of long-chain aliphatic aldehydes to fatty acid - cell detoxification- glucose metabolism	CAGTCGGATCTGCACAAGAG ACCAGGACGAAGGGGTAGTT
Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	ALDH7A1	cell detoxification- glucose metabolism	GGAAGCTTGGTCTCATTGGA ATGGCCAGGTCTTTCTGAAG
5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase	AMPK	Sensor of cellular energy status	GCAAGCCTTTTGTATGCTGT TTCATAAAGGCAGGCTTTGG
Carbohydrate-responsive element-binding protein	ChREBP (MLXIPL)	glucose-induced lipogenesis transcription factor	TCCTCCACTGCAAACTG ACCATGCCGTTGAAAGACTC
cAMP-response element binding protein 2/ Activating transcription factor 2	CREB2/ATF2	Gluconeogenesis	CAGGTCCTTTCTCTGCTG CCTGGGATTCCTGGGATACT
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Glycolysis	CAGAGGACCAGGTTGTCTCC CACCACCGTTGCTGTATC
Glucose transporter 1	GLUT1	transport of glucose	CGGGGATCAATGCGGTTTTTC GTGAAGGGTCTACGTCCAG
Glucose transporter 2	GLUT2	transport of glucose	GGAGTTGACCAACCGTTTA CCCACCTCGAAGAAGATGAC
Hhexokinase 1	HK1	Glycolysis	GAGGGAGCAGACGTTGTGAA GCCGCATCTCCTCATGTAA
Inulin receptor	INSR	insulin recognition and signaling	TGGAGGATACCTGGATCAGC GCAAGTCCTCCTCAGCATC

**Supplemental Table 7**

Informative table on primers used for the study of lipid-related genes.

Lipid-related genes			
Gene name	Gene Symbol	main function	primer sequence
Acetyl-CoA acyltransferase 2	ACAA2	Fatty Acid beta-oxidation	AGTTGGAGGACACCTTGTGG TGCAATGCTTCTTCCCTTT
Acyl-CoA acetyltransferase 1	ACAT1	Formation of acetoacetyl-CoA	GGTATCCCCGTGGAAGAAGT TTCCACCAGCAACCATTACA
Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	ACAD11	Fatty Acid beta-oxidation	TGGTTGTACCTCGAGCTGTG CATCCACATGAGAGGGCTTT
ATP citrate lyase	ACLY	Acetyl-CoA synthesis, lipogenesis	ACCCCACTGTTGGACTATGC GCTTCAAGCGCTTCTGATCT
Acyl-CoA oxidase 1	ACOX1	Fatty Acid beta-oxidation	CATGTTTGAGTGGGCAAGA TTTTCAGGGCAGGAAAATTG
Acyl-CoA synthetase long chain family member 1	ACSL1	Lipid biosynthesis and fatty acid degradation	GGCTGGCTTCATACAGGAGA CTCTTTTCTTGCCCATTTG
Acyl-CoA synthetase short chain family member 1	ACSS1	fatty acid activation by thioester formation with CoA	GATGTGCCCTTGAAGAAGA AGCCTGGGTGTGAACAATTC
Cluster differentiation CD36/ Fatty acid translocase	FAT/CD36	Fatty acid transport and liver steatosis	AGTTTGCCAAAAGGCTTCAA CGAGGAACACCACAGAACCT
Choline/Ethanolamine Phosphotransferase 1 CEPT1	CEPT1	Phospholipid synthesis	CTGCTGTGCAGCTCTTTGAA CGCAGTATCGAAGCAAATCA
Carnitine palmitoyl transferase 1A	CPT1A	Mitochondrial transporter, fatty Acid beta-oxidation	GATTTGGACCAGTGGCTGAT GAAGGTTGCTTTCACCAAT
Diacylglycerol O-acyl transferase 2	DGAT2	Triglyceride synthesis	TGGGGCTTGTACCCTACTC TGGAGAAGATGGGCTGAATC
Fatty acid binding protein 4	FABP4	Fatty acid uptake, transport and metabolism	AATGGCTCACTGAAGCAGGT TGGCTTCTCATGCCTTTTC
Fatty acid synthase	FASN	Fatty acid synthesis	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG CTCCAATAAGGTGCGGTGAT
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1	GPAT1	Lipid synthesis	ACAACCTCAGCGGTCTGTG GCGCTGAGGTAGGAACGTAG
low density lipoprotein receptor class A domain containing	LDLR4	Lipid metabolism	TGTGGCCTTCAGAAAGCTCG ATCTCGTGTGCATGTAGGG
Lipase C hepatic type	LIPC	Hepatic triglyceride lipase, lipoprotein uptake	TCTGCCATCACAGTCTTG TGTTTCCCTGCTTCACTC
Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3 (NR1H3)	LXRa	cholesterol, glucose and fatty acid metabolism in liver- hepatic lipogenesis	CATCTCGACGTACAATCCA GTGTGCTGCAGTCTCTCCAC
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	PPARA	Regulator of lipid metabolism (beta-oxidation) and transport	GGATGCTGGTAGCCTATGGA ACGTGCACAATGCTCTTTG
Peroxisome proliferator activated Receptor gamma	PPARG	Regulator of adipogenesis	CCCAAGTTGAGTTCGCTGT GCTGTGACGACTCTGGATGA
Stearoyl-CoA desaturase 1	SCD1	fatty acid biosynthesis (oleate and palmitoleate)	AGTGTGCTCATGTGTTGG TGAAGTCGATGAAGCTGTG

**Supplemental Table 8**

Informative table on primers used for the study of stress-related genes.

<b>Stress-related genes</b>			
<b>Gene name</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>main function</b>	<b>Primer sequences</b>
Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	CYP2E1	Cellular detoxification	GCCAGATGCCCTACACAGAT GGTACCGTTTGATTGATTGAGGA
DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A2	DNAJA2	protein folding	CTGACTGCAACGGAGAAGGT CTGGAGCCTGATCTGCTTCT
Glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1	Cellular detoxification	CGTTTTTGGTCACAGCATGA ATCCCAAATGCCCATATTT
Glutathione S-transferase theta 1	GSTT1	Cellular detoxification	TGCAGACAAATGGAGACCTG GGCCTTCAAACCTTCTCA
Heat Shock Factor Binding Protein 1	HSBP1	Negative regulator of heat stress response, folding of protein complex	ACTGGAAGGCGAGAACAAGA TCGGTAATCCAAGGGACTG
Heat shock protein 90 alpha family class A member 1	HSP90AA1	protein folding	AGACCATTTGGCTGTCAAGC CAGCTCCTCACAGTTGTCCA
ST13 Hsp70 Interacting Protein or Suppression Of Tumorigenicity 13	ST13	protein folding	TGCAACCAAGAGCTCAGAAA CCTGTCGTCTTGCTTCTCC

## **Amélioration de la production de foie gras chez le canard mulard après une manipulation thermique embryonnaire**

### **Résumé**

L'objectif de cet essai était d'étudier l'impact de différents changements de température d'incubation des œufs de canards mulards sur la physiologie des animaux, de l'éclosion jusqu'en fin de gavage.

Pour répondre à cette question 2000 œufs de canard mulard ont été incubés avec différentes augmentations de la température d'incubation. Les canetons éclos ont été élevés jusqu'à l'âge de 81 jours selon des pratiques standards. Des prélèvements de plasma, de foie, de muscle pectoralis, de gras abdominal et de la cuisse ont été effectués à 15 jours ainsi qu'avant le gavage. Ensuite à l'âge de 81 jours, 200 canards ont été gavés durant 11 jours (21 repas), tous les canards ont été abattus 10 heures après le dernier repas. Les poids vifs des canards ainsi que ceux des foies, du muscle pectoralis, du gras abdominal et de la cuisse ont été enregistrés.

Nos résultats montrent des changements significatifs de la température de surface et du poids corporel à l'éclosion et tout au long de l'élevage. Le gavage a entraîné une augmentation significative du poids vif, des muscles de la cuisse, du tissu adipeux ainsi qu'une augmentation du poids de foie dans tous les groupes traités, tandis que la manipulation thermique embryonnaire induisait une augmentation de poids de foie (jusqu'à +15%) associée à une augmentation du taux de lipides hépatiques. En revanche 2 des groupes MT présentaient une baisse d'éclosion et une hausse du taux de fonte lipidique à la cuisson.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude à démontrer l'impact positif d'une MT embryonnaire sur la production de foie gras chez les canards mulards gavés. Ces résultats nous encouragent à optimiser le processus de programmation par une modulation fine de la durée, de la période embryonnaire ou du niveau d'augmentation de la température afin d'obtenir les meilleurs rendement et qualité de production. En tant que précurseur, cet essai ouvre non seulement un vaste nouveau domaine de recherche agronomique mais suscite également un intérêt fondamental pour les mécanismes sous-jacents impliqués dans la programmation thermique.

**Article 2 (Frontiers in Physiology, 2019):**

**Positive impact of thermal manipulation during embryogenesis on *foie gras* production in mule ducks**

William Massimino<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>2</sup>, Tracy Pioche<sup>1</sup>, Annabelle Tavernier<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>, Cécile Bonnefont<sup>3</sup>, Hélène Manse<sup>3</sup>, Mireille Morisson<sup>3</sup>, Benoit Fauconneau<sup>1</sup>, Anne Collin<sup>4</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>UE-PFG-UE89, Centre INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale sur les Palmipèdes à Foie gras), Domaine d'Artiguères, 1076, route de Haut Mauco, 40280 Benquet, France

<sup>3</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

<sup>4</sup>UMR-BOA, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

**\* Correspondence:**

Dr. Marianne Houssier  
marianne.houssier@univ-pau.fr

**Keywords:** liver steatosis, metabolism, embryonic programming, temperature, poultry.

## Positive impact of thermal manipulation during embryogenesis on foie gras production in mule ducks

William Massimino<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>2</sup>, Tracy Pioche<sup>1</sup>, Annabelle Tavernier<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>, Cécile Bonnefont<sup>3</sup>, Hélène Manse<sup>3</sup>, Mireille Morisson<sup>3</sup>, Benoit Fauconneau<sup>1</sup>, Anne Collin<sup>4</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>\*

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

<sup>2</sup>UE-PFG-UE89, Centre INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale sur les Palmipèdes à Foie gras), Domaine d'Artiguères, 1076, route de Haut Mauco, 40280 Benquet, France

<sup>3</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

<sup>4</sup>UMR-BOA, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

### \* Correspondence:

Dr. Marianne Houssier  
marianne.houssier@univ-pau.fr

**Keywords: embryonic thermal programming, liver steatosis, mule ducks.**

### ABSTRACT

Animal studies have shown that very early life events may have programming effects on adult metabolism and health. In this study, we aim, for the first, time to elucidate the effects of embryonic thermal manipulation (TM) on the performance of overfed mule ducks, in particular for the production of foie gras (fatty liver). We designed three embryonic TMs with different protocols for increasing the incubation temperature during the second part of embryogenesis, to determine whether hepatic metabolism could be “programmed” to improve its fattening response to overfeeding at the age of three months.

Initial results confirm that an increase in the incubation temperature leads to faster development (observed for all treated groups compared to the control group), and a decrease in the body surface temperature at birth. Thereafter, in a very innovative way, we showed that the three TM conditions specifically increased liver weights, as well as liver lipid content after overfeeding compared to the non-TM control group. These results demonstrate that embryonic TM effectively “programs” the metabolic response to the challenge of force-feeding, resulting in increased hepatic steatosis.

Finally, our goal of improving foie gras production has been achieved with three different embryonic thermal stimuli, demonstrating the high reproducibility of the method. However, this repeatability was also perceptible in the adverse effects observed on two groups treated with exactly the same cumulative temperature rise leading to a reduction in hatchability (75 and 76% vs 82% in control), in addition to an increase in the melting rate after cooking.

These results suggest that embryonic thermal programming could be an innovative and inexpensive technique for improving foie gras production, although the specific protocol (duration, level or period of temperature increase), remains to be elucidated in order to avoid adverse effects.

## 1 Introduction

The use of a specific stimulus during a developmental period with high plasticity, often during embryogenesis, has already been characterized as potentially leading to a major phenotypic change in response to a specific challenge encountered later in life (Lucas, 1998). This process, called "programming", can have interesting results in terms of animal health, and may even lead to commercial benefits for the agri-food industry, as illustrated below.

In chickens, high mortality has been observed during exposure to heat stress, resulting in lower profitability in the broiler meat production sector. This observation led researchers to test whether embryonic thermal programming could improve the response of animals to a thermal challenge. They demonstrated that an increase in incubation temperature during the maturation of the hypothalamus-hypophysis-thyroid axis (related to thermoregulation) improves the thermotolerance of broilers by reducing mortality by 50% during a subsequent heat challenge at the age of 35 days (Piestun et al., 2008a). This was manifested by a drop in body temperature associated with a decrease in the plasma content of triiodothyronine hormone (T3) from hatching until age of slaughter (Loyau et al., 2013, 2015; Piestun et al., 2013). Interestingly, this embryonic thermal manipulation (TM) also resulted in an increase in muscle weight at 70 days of age, in the absence of any subsequent heat challenge, leading to enhanced meat production whose benefits are estimated at nearly 1 billion dollars (Piestun et al., 2013). These experiments demonstrate the strong impact that embryonic TM can have on systemic metabolism throughout the life of poultry.

Interestingly, the programming process may also use different stimuli between embryogenesis and a subsequent challenge, resulting in a different phenotypic response. For example, it has been shown that a nutritional stimulus during embryogenesis in chicken (by *in-ovo* feeding) may affect the ability to cope with a heat stress at 9 days of age (Han et al., 2019). In ducks (Pekin breed), it has recently been shown that a continuous rise in incubation temperature results in an increase in liver weight at 2 weeks post-hatching (Liu et al., 2015) and an increase in the activity and expression of hepatic fatty acid synthase (FAS), a key lipogenesis enzyme (Wang et al., 2014). These results suggest that embryonic TM in ducks could enhance lipid storage in the liver, and they inspired us to "program" ducks used for foie gras production (mule breed), in order to improve their response to overfeeding at three months of age.

To produce foie gras, male mule ducks (Marie-Etancelin et al., 2015) are subjected to a 9 to 12-day period of overfeeding (OF) in which large amounts of corn are administered twice a day. This high-carbohydrate diet strongly stimulates hepatic *de novo* lipogenesis and induces liver steatosis (Chartrin et al., 2006; Héroult et al., 2009; Mourrot et al., 2000; Saez et al., 2008; Tavernier et al., 2017), characterized by a huge increase in lipid content, ranging from 5% in lean animals to 50-60% in overfed animals (Hermier et al., 2003). We consider that if embryonic TM in mule ducks positively "programs" the hepatic metabolism during overfeeding, we may have discovered a new, simple and inexpensive way to increase foie gras productivity and reduce the number of meals ingested by speeding up fattening of the liver.

We finally designed three new embryonic TM protocols for mule ducks, based on the different experiments mentioned above (in chickens and Pekin ducks) while trying to avoid the adverse effects on hatching and survival that are sometimes observed (Al-Zhgoul et al., 2013a; Piestun et al., 2008a). In parallel with a control group incubated at 37.6°C, we tested three warming conditions – continuously (+1°C 24 hours a day) or discontinuously (+1°C 16 hours a day and +1.5°C 16 hours a day) – during 50% of the total incubation period (between the 13<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup> embryonic days). The hatching data were first analyzed and then, the response to force-feeding at the age of three months in mule ducks was compared between the control and the thermally manipulated ducks. In order to

evaluate the impact of the TM on overall plasma content (thyroid hormone and metabolites), blood samples were taken during slaughter.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Ethics approval statement

All experimental procedures conformed to the French national guidelines on the care of animals for research purposes. The protocols were approved by the Committee for the Care and Use of Animals in the Greater South-Western France region (no. 73) and finally authorized by the Ministry under the file reference APAFIS14196-201805250850236-v3. The present study was carried out in the certified Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France) – accreditation number B40-037-1.

### 2.2 Animals

A total of 2,000 eggs of mule ducks (genotype H85, provided by Grimaud Frères Selection company, Roussay, France) were kept at room temperature for 3 days prior to incubation and randomly assigned to four incubators, thus determining the four treatment groups (500 eggs each, in four incubators). The control group was maintained at 37.6°C and 47% average relative humidity (RH) throughout the entire incubation period. Thermal manipulations (TMs) occurred during the last 14 days of the incubation period, i.e. from the 13<sup>th</sup> to the 27<sup>th</sup> embryonic days (E13-E27) at 38.6°C, 16 h/day (+1°C 16 h/day), 38.6°C, 24 h/day (+1°C 24 h/day), and 39.1°C 16 h/day (+1.5°C 16 h/day) (Figure 1), with RH set at an average of 63% for all manipulated groups in order to avoid egg dehydration. These experimental conditions corresponded to a temperature rise of +224°C for the first treated group (1°C\*16 h\*14 days), and +336°C for the second and third TM groups (1°C\*24 h\*14 days and 1.5°C\*16 h\*14 days) compared to the control group.

All eggs were turned through 90° every 3 hours. In each incubator, the temperature and hygrometry were continuously measured by a sensor equipped with remote probes (KIMO, KH200). Unfertilized eggs were spotted by candling at E10 and removed from the incubators, with the remaining eggs then being closer together to avoid local temperature disturbance. At E27, all eggs were placed in the same hatcher at 37.3°C and 80% RH. Newly hatched ducks were recorded every day from E27 to E31.

Male ducklings were divided into two groups of 70 for each treatment; they 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, 17.5% crude protein). From 4 to 8 weeks of age, ducklings were fed *ad libitum* with a growing diet (2,800 Kcal, 15.5% crude protein), and hourly rationed between 8 and 12 weeks of age. At 12 weeks, all ducks were overfed with corn meal twice a day (53% corn and 47% water, Palma Maisadour), for 11 days (21 meals). The body weights and surface temperatures (Evolupharm infrared thermometer "Evoluscan+", accurate to +/- 0.1°C), with an average of two consecutive measurements on the rump without feathers), were recorded on days 1, 31, 45, 59, 70, before (D83) and after (D95) overfeeding (OF). The average daily gains were determined at these periods. Ducks were killed by bleeding after stunning in an electric water bath in line with the European Council regulation (Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killingText with EEA relevance) at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France).

The daily feed intake was determined collectively (total feed consumption divided by the number of individuals) until D83 (mean of two collective pens per group) and individually between D84 and D95, corresponding to the OF period.

The feed conversion ratio (FCR) and liver-feed conversion ratio (L-FCR) were determined as the ratio between the individual cumulative consumption and average weight gain and liver weight gain (difference between individual liver weight after OF and mean liver weight per group before OF), respectively.

### 2.3 Collection of samples and plasma analyses

At days 83 and 95 post-hatching, 40 and 50 males per group, respectively, were randomly selected and slaughtered. Blood samples were collected, from all ducks in disodium EDTA tubes after carotid section. Individual plasma was separated by centrifugation at 2,000 g for 10 min at 4°C. Plasma samples were frozen at -20°C for further analysis. Glycemia, triglyceridemia, cholesterol levels and non-esterified fatty acids (NEFA) were quantified by the colorimetric method using an enzymatic kit (Glucose GOD-POD, SOBIODA; Tryglicerides GPO POD, SOBIODA; Cholesterol LD M, SOBIODA, NEFA HR2, Wako, Richmond, USA). Radioimmunoassays of free thyroxin (T4), free triiodothyronine (T3) (RIA FT3 and FT4, Beckman Coulter) were applied to the plasma samples. The intra and inter-assay variations (CV) were 6.4% and 5.5% respectively for T3 and 10.29% and 7.58% respectively for T4. Plasma corticosterone concentrations were measured using a commercially available double antibody RIA-kit (MP Biomedicals, NY, USA) with intra and inter-assay (CV) of 7.1% and 7.2%, respectively. After dissection, the liver, breast muscle, leg muscles, abdominal fat and subcutaneous adipose tissue (SAT) were weighed. Pieces of liver were sampled in the middle of the large lobe for the study of liver lipid content and were stored at -80 °C, or immediately fixed in 4% paraformaldehyde for histological analysis.

### 2.4 Liver lipid content, dry matter and melting rate

Near Infra-Red Spectra (NIRS) were collected in absorbance from 350 to 2,500 nm with an interval of 1 nm using the Labspec® 5000 Pro spectrometer (ASD Inc., Boulder (CO), USA) to predict biochemical liver characteristics as described below. A piece of 15 g of each liver was quenched in liquid nitrogen and stored at -80°C. After grinding in liquid nitrogen, samples were desiccated in an oven at 105 °C for 24 h (JOCE, 1971) to record the dry matter content. For 40 livers collected before the overfeeding period, the total lipid content was measured by extracting all lipids from a 2.0 g sample by homogenization in chloroform methanol 2:1 (v/v) and measured gravimetrically according to the Folch et al. method (Folch et al., 1957). For 50 fatty livers, the same protocol was applied to a 0.3 g sample. The total lipid content was then predicted for all samples by using a prediction equation developed on NIRS spectra according to the method described by Marie-Etancelin et al. (Marie-Etancelin et al., 2014) using previous analyses. The spectrum data were shortened from 650 to 2,350 nm and transformed via a Standard Normal Variate and Detrend 1, 10, 10, 1 normalization. The prediction equation was then based on a modified Partial Least Square (PLS) analysis of the Winisi® software (version 4.6.8, FOSS Analytical A/S, Hilleroed, Denmark).

For the melting test, 60 g samples were taken from the middle part of the livers and placed in a tin can used for the melting test. The tin cans were cooked in an autoclave at 85 °C for 60 min. The cans were subsequently chilled using tap water and stored at 4°C for two months to mimic the mean commercial storage period. After this storage period, the cans were heated in a water bath (75-80°C, 20 min), 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.

### 2.5 Histological analysis

Liver samples (seven per group) were fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and cut into 10 µm thick sections. Microscope slides were stained using Masson's Trichrome. Liver sections were scanned with a Panoramic scanner 250 from 3dHistech with 40x magnification. The degree of

steatosis, hepatocyte ballooning and fibrosis was scored using Masson's Trichrome-stained liver sections. Each variable was graded from zero (none) to three (severe). ImageJ 1.52 software was used to measure the lipid droplet diameter in each group (mean of 2 representative fields per slide,  $n=7$  liver sections per group). The image was first converted to 16 bits in black and white, then an automatic threshold was applied with a dark background, and the area of circular objects over  $48\mu\text{m}^2$  was measured automatically. A binary watershed was used to separate touching droplets and objects touching the edge of the image were removed.

## 2.6 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism version 8 for windows (GraphPad software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) (serial number *GP8-1598457-RJQD-5E2EC*)). When the dataset had a Normal distribution (assessed by Shapiro–Wilk test), the variances of the 4 groups were tested with a one-way ANOVA to determine whether the observed factor (TM) had a significant impact on the measured parameter. In the event of a significant difference, a Tukey post-hoc multiple comparison test was performed to identify the differences among the means of the 4 groups. When the Normal distribution was not demonstrated, a Kruskal–Wallis test was performed as a non-parametric variance analysis followed by a Dunn test as a post-hoc multiple comparison analysis.

When two factors were tested on the same graph (OF and TM), the variances were first tested with a two-way ANOVA (with treatment: control vs. TM, and sub-treatment: Pre-OF vs. Post-OF). In the event of a significant difference, a Tukey post-hoc analysis was then performed to compare all groups with each other. The model includes an interaction test between these effects.

Hatchability and sex ratio data were analyzed by the chi-square test.

The data are presented as the average  $\pm$  standard error of mean (SEM). In every case, differences between the groups were considered statistically significant if the value of  $P < 0.05$ .

## 3 Results

### 3.1 Zootechnical data from hatching up to day 17 after hatching (D17)

First, the potential impact of incubation temperature on hatching data was examined. Even if no difference was measured between the moderately treated ( $+1^\circ\text{C}$  16 h/day) and control groups ( $P > 0.1$ ), the hatching process was clearly affected by the thermal manipulation, as we measured a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in hatching success in the thermally manipulated groups with an increase of  $1^\circ\text{C}$  24 h/day and of  $1.5^\circ\text{C}$  16 h/day (76% and 75% of hatchability respectively versus 82% for the controls) (Figure 2a). It is interesting to note that these two last TM groups presented exactly the same cumulative increase in temperature ( $+336^\circ\text{C}$ ), while the  $+1^\circ\text{C}$  16 h/day group accumulated much less heat during the incubation period ( $+224^\circ\text{C}$ ). No sex-ratio difference was observed between the control and treated groups (Figure 2b), but the mean incubation time was reduced by about one day in all TM groups compared to control ( $P < 0.0001$ ). Indeed, at D29, 70-95% of TM animals hatched against 40% for the control group (Figure 2c).

Finally, significant decreases in total body weight (from 3.48g to 5.56g) and body surface temperature (between  $0.4^\circ\text{C}$  and  $0.8^\circ\text{C}$ ) were observed at hatching for the 3 TM groups compared to control (Figure 2d,e). Total body weight no longer differed between control and TM groups at D17 ( $P > 0.1$ ; Table 1b), nor did liver, abdominal fat and leg muscle weights (data not shown).

### 3.2 Growth performance and body surface temperature from first feeding up to overfeeding

Changes in body surface temperature and body weight throughout the rearing phase are presented in Table 1 (a and b). All TM conditions sharply reduced body surface temperature from hatching (between 0.4°C and 0.8°C) until D59 (between 2.3°C and 2.7°C), except at D31, corresponding to the shutdown of heating in the pens. No difference was observed before and after overfeeding.

TM-treated groups compensated for their body weight deficiency in just two weeks post hatching, and even exceeded the controls between D45 and D59 (Table 1b). At D70, a significant increase in BW for the group with a rise of 1°C 24 h/day was still observed, but these differences completely disappeared at the beginning of overfeeding period.

These results should be analyzed in conjunction with the daily weight gain, also increased in the TM groups during the D31-D44 period and decreased during the D59-D69 period (Table 2), respectively correlated to a better and worse feed conversion ratio (FCR) compared to the control group (data not shown).

Finally, all differences in temperature and body weight between treatments had disappeared at the beginning of overfeeding period.

### 3.3 Plasma metabolites and hormones before and after overfeeding

The lipid and hormone plasmatic concentrations are presented in Table 3. Before OF (left-hand panel) one TM group (+1°C 16 h/day) presented a significant increase in corticosterone level compared to control, but this difference was no longer observed after OF (right-hand panel).

As expected, OF strongly altered the lipid parameters. Indeed, glucose, triglycerides and cholesterol concentrations rose sharply after 21 forced meals in all groups, while free fatty acids decreased slightly. OF also significantly affected plasma hormone levels, as a substantial increase in T3 and a large decrease in corticosterone were measured, but no differences were observed between the TM and control groups. T4 plasmatic concentrations also dropped slightly after OF compared to before OF, but no difference was observed between the TM and control groups.

### 3.4 Body composition before and after overfeeding

The impacts of overfeeding and TM treatments are shown in Figure 3. First, all groups exhibited a higher total body weight, and liver, abdominal fat, leg muscle and subcutaneous fat weights after OF compared to before OF (Figure 3a, b, c, d, e). Interestingly, the effect of TM was only highlighted for liver and abdominal fat weights, which were significantly enhanced in all TM-treated groups after OF compared to their own control (Figure 3b, c). This increase in liver weight was associated with a greater increase in lipid content in the TM groups after OF (Figure 3g). However, despite the TM groups having better L-FCR than the controls (Figure 3h), we measured an increase in the melting rate for the TM-treated groups +1°C 24 h/day and +1.5°C 16 h/day (Figure 3i), corresponding to the cumulative temperature rise of +336°C.

Afterwards, although we did not measure any change in the grade of liver steatosis assessed by Masson's trichrome coloration (data not shown), we recorded a substantial rise in the size of vesicular lipid droplets in the same two treated groups, which reflects an increase in the melting rate after OF compared to the control group (figure 4).

## 4 Discussion

Several studies have previously shown that embryonic thermal manipulation (TM) could enhance adult poultry performance characteristics, such as thermoregulation during acute heat stress and breast muscle yield (Al-Rukibat et al., 2017a; Piestun et al., 2011, 2013). For the first time, we have shown that a moderate increase in incubation temperature during the second half of embryogenesis could improve foie gras production (by up to 15%) in adult male mule ducks.

#### 4.1 Early impact of embryonic TM

The actual impact of embryonic TM on hatchability remains to be clarified, as the results can be totally inconsistent according to the temperature variation, period and duration of the treatment (Al-Rukibat et al., 2017a; Collin et al., 2005; Loyau et al., 2013; Nariç et al., 2016; Piestun et al., 2008a). Furthermore, most of the previous studies were conducted on chicken, raising the possibility that different species could respond differently to TM. Firstly, our results confirm previous data showing early hatching in the event of increased incubation temperature for all treated groups (DuRant et al., 2010, 2011, 2013; Hepp and Kennamer, 2012). Secondly, higher discontinuous (+1.5°C 16 h/day) and lower but constant (+1°C 24 h/day) increases in incubation temperature significantly reduced hatching success compared to the control group. On the contrary, a moderate but discontinuous temperature rise (+1°C 16 h/day) did not affect hatchability. These results suggest that in mule ducks as in broilers (Piestun et al., 2008a), continuous TM has a more negative effect on hatching performance than intermittent TM, and reveal that ducks are more sensitive to moderate temperature increases during embryogenesis than broilers. However, several studies reported that hatching success in mule ducks was generally measured at between 70% and 80% of fertile eggs (Brun et al., 2005; Marie-Etancelin et al., 2008), which implies that even though this capacity is clearly affected by heat treatment, hatching performance remains in the same range (at between 75% and 82%). Concerning the sex ratio, TM did not change the imbalance induced by mule hybrid generation, leading to an increase in female embryonic mortality (Batellier et al., 2004).

As frequently described for chickens and turkeys, the body weight (Al-Rukibat et al., 2017a; Piestun et al., 2008a) and body surface temperature (Al-Zghoul et al., 2015; Loyau et al., 2013) of TM ducks were significantly lower than those of the controls on hatching day. However, while lower body surface temperatures were maintained in all treated groups until 59 days of breeding, TM ducks compensated for their growth retardation in as few as 17 days after birth, and even exceeded the weight of control ducks between 45 and 59 days of age. Finally, these disparities diminished at the end of breeding to reach control level, with differences no longer observed at the start of the overfeeding procedure.

Thyroid hormones participate in the regulation of heat production and thermo-tolerance acquisition in poultry, and embryonic TM obviously affects their plasmatic concentrations in chickens, both during incubation and after hatching (Piestun et al., 2009). However, the mid-term consequences of embryonic TM on thyroid activity are still controversial. Indeed, plasma measurements of T3 and T4 concentrations in chicken raised under normal temperature conditions but previously subjected to embryonic TM may give rise to conflicting results. Piestun et al. (Piestun et al., 2011) showed a decrease in T3 and T4 plasma level a few weeks after hatching, Loyau et al. (Loyau et al., 2013) measured a drop in the T3/T4 concentration ratio in 28-day-old chickens but no longer afterwards, while another study highlighted an increase in both hormones until 42 days post-hatching (Al-Zghoul et al., 2013b). In the present study, embryonic TM did not alter T3 and T4 plasma concentrations in ducklings at two weeks of age (data not shown). These results are consistent with previous research (Piestun et al., 2008b) and suggest that thyroid axis activity is not strongly altered in the absence of additional thermal challenge, even if body surface temperatures were reduced for several weeks.

Very few studies of the impacts of TM on ducks have been carried out so far. Nevertheless, Liu *et al.* have demonstrated that a continuous rise of 1°C in the incubation temperature during the second half of embryogenesis led to an increase in body weight and liver relative weight at 2 weeks post-hatching (Liu et al., 2015). These results prompted us in the present study to examine the hypothesis of enhanced hepatic metabolism after TM in mule ducks, which could be particularly beneficial for foie

gras production. However, these results were not reproduced in mule ducks at two weeks of age, as the total body and liver weights remained unchanged for all treated groups (data not shown).

#### 4.2 Effect of TM manipulations on plasma parameters before and after overfeeding

The consequences of embryonic TM in adult poultry have often been studied in the restricted context of acute heat stress response capacity. The aim of this trial was to evaluate liver fattening in overfed adult mule ducks previously treated with three types of embryonic TM. The four groups were submitted to the same overfeeding (OF) conditions for 11 days at 12 weeks of age (21 meals). Since thermally manipulated Pekin ducks present an increase in plasma cholesterol two weeks after hatching (Wang et al., 2014), and given that the differential genetic ability of OF-induced fattening of the liver has been related to distinct levels of triglyceridemia or circulating free fatty acids (Hermier et al., 2003; Tavernier et al., 2017), we evaluated the impact of embryonic TM on plasma metabolite concentrations in mule ducks. We then found that even if OF strongly increases the plasma content of glucose, TG, and cholesterol as previously shown (Chartrin et al., 2006; Davail et al., 2003; Hermier et al., 2003; Marie-Etancelin et al., 2011), no effect of incubation temperature on these variables was observed, around hatching (data not shown) and before or after OF. These data again suggest that incubation temperature has no impact on the metabolic parameters of plasma in the absence of further thermal challenge.

OF also induced a sharp decrease in the corticosterone content of plasma in mule ducks in all groups compared to animals collected prior to overfeeding. As corticosterone may reflect the stress response (Harvey et al., 1980), these results are consistent with those of a previous study on overfed mule ducks, revealing habituation to physical restraint during OF (Guémené et al., 2006). Again, no effect of TM was measured at this stage compared to the overfed control group.

In the same way, thyroid hormones were also altered by OF, since we recorded a significant increase in triiodothyronine (T3) and a slight decrease in thyroxin (T4) content in the plasma of all overfed groups compared to animals sampled before OF. Since the plasma content of T3 (the active form) may result from both thyroid secretion and peripheral deiodination of T4 (Pittman et al., 1971; Surks et al., 1973), in our trial, it is not surprising to observe a decrease in T4 at the same time as an increase in T3. In both humans and rodents, it has long been known that T3 production is stimulated by overfeeding (Danforth et al., 1979; Katzeff, 1990), which is supposedly responsible for an increase in energy expenditure by non-shivering thermogenesis in order to limit weight gain (Acheson et al., 1984; Stock, 1989). A decrease in diet-induced thermogenesis has also been associated with obesity (Trayhurn, 2017). Therefore, in the context of foie gras production in ducks, and based on several data showing better thermoregulation in thermally manipulated birds (Al-Rukibat et al., 2017b; Zaboli et al., 2017), we hypothesized that embryonic TM could reduce OF-induced thermogenesis due to downregulation of the thyroid axis and thus improve liver fattening. However, in the present study, no programming effect was revealed on the T3 and T4 concentrations compared to the control group or on the T3/T4 ratio, despite some slight variations between TM subgroups. In addition, no difference in body surface temperature was observed after OF.

However, even though we did not confirm the role of T3 hormone and thermogenesis in the improvement of liver fattening observed in thermally manipulated ducks, it might be interesting to measure the OF response in summer, when the thermoregulatory capacity is challenged.

#### 4.3 TM manipulations significantly affect overfeeding-induced liver fattening

Finally, as expected, overfeeding induced a strong increase in total body, adipose tissue, liver and leg muscle weights in all groups (Davail et al., 2003; Hermier et al., 2003; Lo et al., 2017). Interestingly, all TM conditions specifically enhanced liver and abdominal fat weights after OF compared to their own controls. In liver, this rise occurred in parallel with an increase in lipid content in the three treated groups compared to control, suggesting that lipid metabolism remains affected for several months after the change in temperature. These data strongly suggest that in mule ducks, an increase in incubation temperature during embryogenesis results in true metabolic programming. The liver fattening was, however, combined with a higher melting rate in two of the three treated groups, implying that the primary conditions of embryonic TM could be optimized to obtain the best-quality foie gras, in particular by choosing a moderate discontinuous thermal manipulation. In addition, histological analysis also led us to conclude that embryonic TM may modify the type of hepatic fattening during OF, since we measured a significant increase in large vesicles in the same groups that presented a high melting rate, confirming previous results (Theron et al., 2011). In the future, it could be interesting to examine this observation in detail in order to determine the existence of a potential correlation between both characteristics, which could imply differential metabolic mechanisms such as cell hyperplasia or hypertrophy.

It is particularly interesting to note that the two most challenging TM conditions (+1°C 24 h/day and +1.5°C 16 h/day) – fortuitously corresponding to the same cumulative increase in temperature (a total of +336°C) – led to the same phenotype in term of hatchability, the surface area of lipid droplets and liver melting rate.

These results suggest that foie gras production could be optimized extremely precisely by embryonic thermal manipulation, and that the cumulative rise in temperature should probably not exceed 336°C. Accurate knowledge of lipid and carbohydrate metabolism during embryogenesis may also be useful in choosing the best programming period during which the duration and the level of temperature change could be modulated without exceeding this threshold. Indeed, this trial has shown the strict positive impact of a cumulative temperature increase of 224°C, corresponding to the +1°C 16 h/day group, which enabled the same increase in foie gras production as the other TM groups without any negative impact on hatchability or the melting rate. These results open up many opportunities for improving foie gras production

#### 4.4 Conclusion

In this way, a moderate embryonic thermal manipulation induced accelerated development, a potential reduction in thermogenesis suggested by reduced body surface temperature, and an increase in hepatic steatosis after OF. We have also confirmed a potential link between hepatic lipid vesicle size and the melting rate, which is one of the most important traits of the technological performance of foie gras. To our knowledge, this is the first study to demonstrate a positive impact of embryonic thermal manipulation on foie gras production in overfed mule ducks. As a precursor, this trial not only opens a broad new field of agronomic research but also arouses fundamental interest in the underlying mechanisms involved in “thermal programming”.

## 5 Data availability

All data used in this study are available from the corresponding author.

## 6 Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted with the partial support of the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie gras” (CIFOG).

## 7 Author Contributions

M.H., S.P., A.C., S.D., M.M. and W.M. conceived and designed the study. W.M. conducted all the experiments and analyses with the help of M.H., T.P., K.R., K.G., and A.T.. M.D.B supervised the whole breeding, overfeeding and slaughtering phases. All authors reviewed the manuscript.

## 8 Acknowledgements

This work was supported by grants from the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie gras (CIFOG) and from “Comité Départemental des Landes” (CD40). We thank all the technicians of the Artigueres experimental station for the daily care given to the animals and the monitoring of the good conditions for the experiments.

## 9 References

- Acheson, K., Jéquier, E., Burger, A., and Danforth, E. (1984). Thyroid hormones and thermogenesis: the metabolic cost of food and exercise. *Metab. Clin. Exp.* 33, 262–265.
- Al-Rukibat, R. K., Al-Zghoul, M. B., Hananeh, W. M., Al-Natour, M. Q., and Abu-Basha, E. A. (2017a). 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. doi:10.3382/ps/pew298.
- Al-Rukibat, R. K., Al-Zghoul, M. B., Hananeh, W. M., Al-Natour, M. Q., and Abu-Basha, E. A. (2017b). 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. doi:10.3382/ps/pew298.
- Al-Zghoul, M.-B., Dalab, A. E. S., Yahya, I. E., Althnaian, T. A., Al-ramadan, S. Y., Ali, A. M., et al. (2015). Thermal manipulation during broiler chicken embryogenesis: Effect on mRNA expressions of Hsp108, Hsp70, Hsp47 and Hsf-3 during subsequent post-hatch thermal challenge. *Research in Veterinary Science* 103, 211–217. doi:10.1016/j.rvsc.2015.10.015.
- Al-Zhgoul, M.-B., Dalab, A. E. S., Ababneh, M. M., Jawasreh, K. I., Busadah, K. A. A., and Ismail, Z. B. (2013a). Thermal manipulation during chicken embryogenesis results in enhanced Hsp70 gene expression and the acquisition of thermotolerance. *Research in Veterinary Science* 95, 502–507. doi:10.1016/j.rvsc.2013.05.012.
- Al-Zhgoul, M.-B., Dalab, A. E. S., Ababneh, M. M., Jawasreh, K. I., Busadah, K. A. A., and Ismail, Z. B. (2013b). Thermal manipulation during chicken embryogenesis results in enhanced Hsp70 gene expression and the acquisition of thermotolerance. *Research in Veterinary Science* 95, 502–507. doi:10.1016/j.rvsc.2013.05.012.
- Batellier, F., Marchal, F., Scheller, M. F., Gautron, J., Sellier, N., Taouis, M., et al. (2004). Sex ratios in mule duck embryos at various stages of incubation. *Theriogenology* 61, 573–580. doi:10.1016/S0093-691X(03)00208-5.
- Brun, J., Richard, M. M., Marie-Etancelin, C., Rouvier, R., and Larzul, C. (2005). Le canard mulard: déterminisme génétique d'un hybride intergénérique. *PRODUCTIONS ANIMALES-PARIS-INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE*- 18, 295.

- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., et al. (2006). Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145, 390–396. doi:10.1016/j.cbpa.2006.07.014.
- Collin, A., Picard, M., and 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. doi:10.1051/animres:2005004.
- Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killingText with EEA relevance 30.
- 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.
- Davail, S., Rideau, N., Guy, G., André, J.-M., Hermier, D., and Hoo-Paris, R. (2003). Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 134, 707–715. doi:10.1016/S1095-6433(02)00365-3.
- DuRant, S. E., Hepp, G. R., Moore, I. T., Hopkins, B. C., and 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. doi:10.1242/jeb.034488.
- 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. *Physiological and Biochemical Zoology* 86, 410–420. doi:10.1086/671128.
- DuRant, S. E., Hopkins, W. A., and Hepp, G. R. (2011). Embryonic Developmental Patterns and Energy Expenditure Are Affected by Incubation Temperature in Wood Ducks (*Aix sponsa*). *Physiological and Biochemical Zoology* 84, 451–457. doi:10.1086/661749.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Guémené, D., Guy, G., Noirault, J., Destombes, N., and Faure, J.-M. (2006). Rearing conditions during the force-feeding period in male mule ducks and their impact upon stress and welfare. *Animal Research* 55, 443–458. doi:10.1051/animres:2006028.
- Han, G., Yang, H., Wang, Y., Zhang, R., Tashiro, K., Bungo, T., et al. (2019). Effects of *in ovo* feeding of L-leucine on amino acids metabolism and heat-shock protein-70, and -90 mRNA expression in heat-exposed chicks. *Poultry Science* 98, 1243–1253. doi:10.3382/ps/pey444.
- Harvey, S., Merry, B. J., and Phillips, J. G. (1980). Influence of stress on the secretion of corticosterone in the duck (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Endocrinology* 87, 161–171.
- Hepp, G. R., and Kennamer, R. A. (2012). Warm Is Better: Incubation Temperature Influences Apparent Survival and Recruitment of Wood Ducks (*Aix sponsa*). *PLoS ONE* 7, e47777. doi:10.1371/journal.pone.0047777.

- Héroult, F., Saez, G., Robert, E., Al Mohammad, A., Davail, S., Chartrin, P., et al. (2009). Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Animal Genetics* 41, 12–20. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01959.x.
- Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J.-M., and Hoo-Paris, R. (2003). Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135, 663–675. doi:10.1016/S1096-4959(03)00146-5.
- JOCE (1971). JOCE. Journal officiel des Communautés Européennes. Dosage de l'humidité. JOCE L279/8. Eur-Op News, Luxembourg. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/oj/direct-access.html?locale=fr> [Accessed March 27, 2018].
- Katzeff, H. L. (1990). Increasing age impairs the thyroid hormone response to overfeeding. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194, 198–203.
- 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 (*Anas platyrhynchos domestica*). *Journal of Thermal Biology* 53, 80–89. doi:10.1016/j.jtherbio.2015.08.013.
- Lo, B., Marty-Gasset, N., Canlet Cécile, Tremblay-Franco Marie, Molette Caroline, Viala Didier, et al. (2017). Evolution du métabolisme hépatique au cours du gavage et impact sur la fonte lipidique. *12ème Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*.
- 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. *Journal of animal science* 91, 3674–3685.
- Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr.* 128, 401S–406S.
- Marie-Etancelin, C., Basso, B., Davail, S., Gontier, K., Fernandez, X., Vitezica, Z. G., et al. (2011). Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 89, 669–679. doi:10.2527/jas.2010-3091.
- Marie-Etancelin, C., Chapuis, H., Brun, J. M., Larzul, C., Mialon-Richard, M. M., and Rouvier, R. (2008). Genetics and selection of mule ducks in France: a review. *World's Poultry Science Journal* 64. doi:10.1017/S0043933907001791.
- Marie-Etancelin, C., Retailleau, B., Alinier, A., and Vitezica, Z. G. (2015). Sex impact on the quality of fatty liver and its genetic determinism in mule ducks. *Journal of Animal Science* 93, 4252–4257. doi:10.2527/jas.2015-9121.
- Marie-Etancelin, C., Vitezica, Z. G., Bonnal, L., Fernandez, X., and Bastianelli, D. (2014). Selecting the quality of mule duck fatty liver based on near-infrared spectroscopy. *Genet. Sel. Evol.* 46, 38. doi:10.1186/1297-9686-46-38.

- Mourot, J., Guy, G., Lagarrigue, S., Peiniau, P., and Hermier, D. (2000). Role of hepatic lipogenesis in the susceptibility to fatty liver in the goose (*Anser anser*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 126, 81–87. doi:10.1016/S0305-0491(00)00171-1.
- Narınç, D., Erdoğan, S., Tahtabiçen, E., and Aksoy, T. (2016). Effects of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chickens on developmental stability, hatchability and chick quality. *animal* 10, 1328–1335. doi:10.1017/S1751731116000276.
- Piestun, Y., Druyan, S., Brake, J., and Yahav, S. (2013). Thermal manipulations during broiler incubation alter performance of broilers to 70 days of age. *Poultry Science* 92, 1155–1163. doi:10.3382/ps.2012-02609.
- Piestun, Y., Halevy, O., Shinder, D., Ruzal, M., Druyan, S., and Yahav, S. (2011). Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. *Journal of Thermal Biology* 36, 469–474. doi:10.1016/j.jtherbio.2011.08.003.
- 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. *Journal of Applied Physiology* 106, 233–240. doi:10.1152/jappphysiol.91090.2008.
- Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J., and Yahav, S. (2008a). Thermal Manipulations During Broiler Embryogenesis: Effect on the Acquisition of Thermotolerance. *Poultry Science* 87, 1516–1525. doi:10.3382/ps.2008-00030.
- Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., and Yahav, S. (2008b). The effect of thermal manipulations during the development of the thyroid and adrenal axes on in-hatch and post-hatch thermoregulation. *Journal of Thermal Biology* 33, 413–418. doi:10.1016/j.jtherbio.2008.06.007.
- Pittman, C. S., Chambers, J. B., and Read, V. H. (1971). The extrathyroidal conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in normal man. *J. Clin. Invest.* 50, 1187–1196. doi:10.1172/JCI106596.
- Saez, G., Baéza, E., Davail, S., Durand, D., Bauchart, D., and Gruffat, D. (2008). Is the hepatic metabolism of glucose and linoleic acid influenced by species in overfed ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 576–581. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.015.
- Stock, M. J. (1989). The role of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Proc Nutr Soc* 48, 189–196.
- Surks, M. I., Schadow, A. R., Stock, J. M., and Oppenheimer, J. H. (1973). Determination of iodothyronine absorption and conversion of L-thyroxine (T<sub>4</sub>) to L-triiodothyronine (T<sub>3</sub>) using turnover rate techniques. *J. Clin. Invest.* 52, 805–811. doi:10.1172/JCI107244.
- Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., and Gontier, K. (2017). Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 424, 147–161. doi:10.1007/s11010-016-2850-7.
- Theron, L., Fernandez, X., Marty-Gasset, N., Pichereaux, C., Rossignol, M., Chambon, C., et al. (2011). Identification by proteomic analysis of early post-mortem markers involved in the variability

in fat loss during cooking of mule duck “foie gras.” *J. Agric. Food Chem.* 59, 12617–12628. doi:10.1021/jf203058x.

Trayhurn, P. (2017). Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. *Biochimie* 134, 62–70. doi:10.1016/j.biochi.2016.09.007.

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. *Journal of Thermal Biology* 43, 40–45. doi:10.1016/j.jtherbio.2014.05.001.

Zaboli, G.-R., Rahimi, S., Shariatmadari, F., Torshizi, M. A. K., Baghbazadeh, A., and Mehri, M. (2017). Thermal manipulation during Pre and Post-Hatch on thermotolerance of male broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Poultry Science* 96, 478–485. doi:10.3382/ps/pew344.

## Figure and figure legends

**Table 1. Breeding data**

**a-b.** Mean body surface temperature (a), and weight (b), of male mule ducks from day 1 post-hatching (D1) to day 95 post-hatching (D95) in control and temperature-manipulated groups.

Based on Shapiro test results, Kruskal-wallis (KW) or one-way ANOVA (followed by Dunn’s or Tuckey’s multiple comparison test comparing the mean of each group on the same day) were performed. Values without common letters were statistically different.

**a.**

Average Temperature of the Body Surface (°C)	Control	+1°C 16h/24h	+1°C 24h/24h	+1.5°C 16h/24h	Test	P value
<b>D1</b>	39.0 ± 0.1 (a)	38.6 ± 0.1 (b)	38.6 ± 0.1 (b)	38.2 ± 0.0 (c)	KW	<0.0001
<b>D31</b>	35.2 ± 0.1	35.2 ± 0.1	35.4 ± 0.1	35.4 ± 0.1	KW	0.59
<b>D45</b>	33.8 ± 0.2 (a)	31.8 ± 0.2 (c)	32.6 ± 0.2 (b)	32.3 ± 0.2 (bc)	ANOVA	<0.0001
<b>D59</b>	33.3 ± 0.2 (a)	30.5 ± 0.2 (b)	31.0 ± 0.2 (b)	30.6 ± 0.2 (b)	KW	<0.0001
<b>D70</b>	31.9 ± 0.2 (ab)	32.0 ± 0.2 (ab)	31.4 ± 0.2 (b)	32.5 ± 0.1 (a)	ANOVA	<0.0001
<b>D83</b>	34.8 ± 0.2	35.2 ± 0.2	35.2 ± 0.2	34.5 ± 0.2	KW	0.04
<b>D95</b>	35.0 ± 0.1	35.0 ± 0.1	35.1 ± 0.1	35.2 ± 0.1	ANOVA	0.53

**b.**

Average Body Weight (g)	Control	+1°C 16h/24h	+1°C 24h/24h	+1.5°C 16h/24h	Test	P value
<b>D1</b>	48.2 ± 0.3 (a)	44.7 ± 0.3 (b)	42.6 ± 0.4 (c)	43.9 ± 0.4 (bc)	KW	<0.0001
<b>D17</b>	481.5 ± 4.1 (ab)	479.8 ± 4.4 (b)	495.2 ± 6.7 (ab)	506.9 ± 6.7 (a)	KW	0.026
<b>D31</b>	1669 ± 13 (ab)	1646 ± 14 (b)	1713 ± 16 (a)	1719 ± 17 (a)	ANOVA	0.0012
<b>D45</b>	2622 ± 22 (b)	2770 ± 23 (a)	2833 ± 22 (a)	2760 ± 26 (a)	ANOVA	<0.0001
<b>D59</b>	3684 ± 30 (c)	3808 ± 29 (b)	3943 ± 29 (a)	3865 ± 31 (ab)	ANOVA	<0.0001
<b>D70</b>	4167 ± 36 (b)	4181 ± 33 (b)	4351 ± 39 (a)	4240 ± 35 (ab)	ANOVA	0.0009
<b>D83</b>	4562 ± 39 (ab)	4522 ± 38 (b)	4683 ± 41 (a)	4576 ± 41 (ab)	ANOVA	0.03
<b>D95</b>	6102 ± 54	6144 ± 46	6208 ± 51	6191 ± 49	KW	0.37

**Table 2. Effect of temperature manipulation on average daily gain (ADG)**

a. Daily gain were determined using body weight of animal from day 1 to day 17 (n=122-151), from day 18 to day 30 (n=94-96), from day 31 to day 44 (n=93-96), from day 45 to day 58 (n=92-94), from day 59 to day 69 (n=90-95), from day 70 to 83 (n=88-91) and from day 84 to day 95 (n=46-52). Based on Shapiro test results, Kruskal-wallis (KW) or one-way ANOVA (followed by Dunn's or Tuckey's multiple comparison test comparing the mean of each group on the same period) were performed. Values without common letters were statistically different.

Average Daily Gain (g/day/animal)	Control	+1°C 16h/24h	+1°C 24h/24h	+1.5°C 16h/24h	Test	P value
<b>D1-D17</b>	27.09 ± 0.25 (b)	27.16 ± 0.27 (b)	28.31 ± 0.41 (ab)	28.93 ± 0.40 (a)	KW	0.0016
<b>D18-D30</b>	91.20 ± 0.72 (ab)	89.44 ± 0.78 (b)	93.38 ± 0.79 (a)	93.20 ± 0.80 (a)	ANOVA	0.0007
<b>D31-D44</b>	73.26 ± 1.07 (c)	86.62 ± 1.11 (a)	86.16 ± 0.97 (a)	80.68 ± 1.07 (b)	KW	<0.0001
<b>D45-D58</b>	81.56 ± 1.92 (b)	80.77 ± 1.26 (b)	86.95 ± 1.31 (a)	83.91 ± 1.25 (ab)	KW	0.0013
<b>D59-D69</b>	48.90 ± 1.53 (a)	38.77 ± 1.12 (b)	40.94 ± 1.54 (b)	38.08 ± 1.39 (b)	ANOVA	<0.0001
<b>D70-D83</b>	33.54 ± 1.29 (a)	28.20 ± 1.01 (b)	26.24 ± 1.16 (b)	29.85 ± 1.13 (a)	ANOVA	<0.0001
<b>D84-D95 (OF)</b>	139.3 ± 2.03	142.5 ± 2.64	135.9 ± 2.09	142.4 ± 1.99	ANOVA	0.119

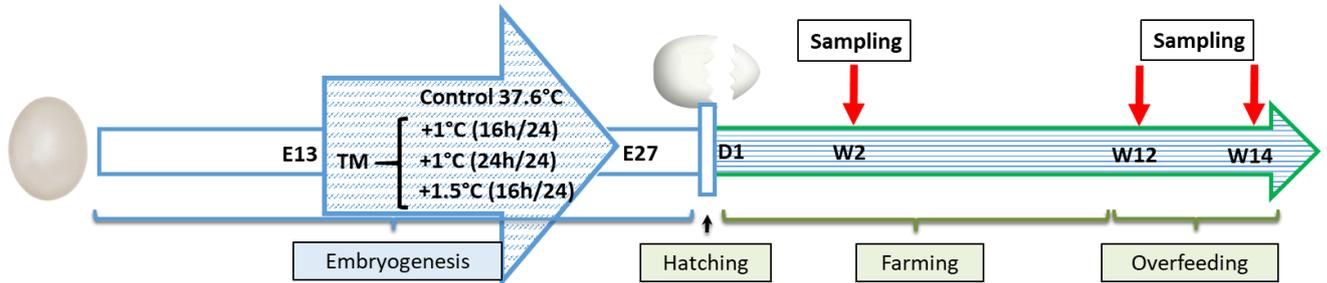
**Table 3. Plasma data**

a-b. Mean plasma concentrations of different metabolites in male mule ducks before (Pre-OF) and after overfeeding (post-OF). Two-way ANOVA (followed by Tuckey's multiple comparison test) was performed. Values without common letters were statistically different. ns = non significant.

Average plasma concentrations	Pre-Overfeeding (D84)				Post-Overfeeding (D95)				OF effect (p value)	TM effect (p value)	Interaction (p value)
	Control	+1°C 16h/24h	+1°C 24h/24h	+1.5°C 16h/24h	Control	+1°C 16h/24h	+1°C 24h/24h	+1.5°C 16h/24h			
<b>Glucose (g/L)</b>	2.22 ± 0.08	2.41 ± 0.09	2.41 ± 0.07	2.34 ± 0.09	3.00 ± 0.17	3.11 ± 0.11	2.92 ± 0.08	3.00 ± 0.13	<0.0001	ns	ns
<b>Triglycerides (g/L)</b>	0.94 ± 0.08	1.17 ± 0.09	1.14 ± 0.11	1.02 ± 0.05	3.74 ± 0.28	4.26 ± 0.24	3.60 ± 0.21	3.79 ± 0.22	<0.0001	ns	ns
<b>Cholesterol (g/L)</b>	1.80 ± 0.14	2.02 ± 0.15	2.06 ± 0.11	1.85 ± 0.09	3.18 ± 0.13	3.54 ± 0.15	3.66 ± 0.15	3.31 ± 0.17	<0.0001	ns	ns
<b>FFA (g/L)</b>	0.26 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.0165	ns	ns
<b>Corticosterone (ng/mL)</b>	81 ± 9	130 ± 10	102 ± 10	99 ± 12	42 ± 6	51 ± 5	45 ± 7	41 ± 5	<0.0001	0.0064	ns
<b>Free T3 (pmol/L)</b>	3.79 ± 0.17	3.71 ± 0.17	3.69 ± 0.21	4.42 ± 0.19	6.82 ± 0.28	7.13 ± 0.29	6.09 ± 0.25	6.89 ± 0.31	<0.0001	0.0147	ns
<b>Free T4 (pmol/L)</b>	9.36 ± 0.26	9.50 ± 0.43	10.01 ± 0.21	9.89 ± 0.40	6.75 ± 0.64	7.70 ± 0.79	8.39 ± 0.58	9.09 ± 0.55	<0.0001	0.0365	ns
<b>Ratio T3/T4</b>	0.40 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.02	1.00 ± 0.10	0.88 ± 0.10	0.75 ± 0.09	0.81 ± 0.06	<0.0001	ns	ns

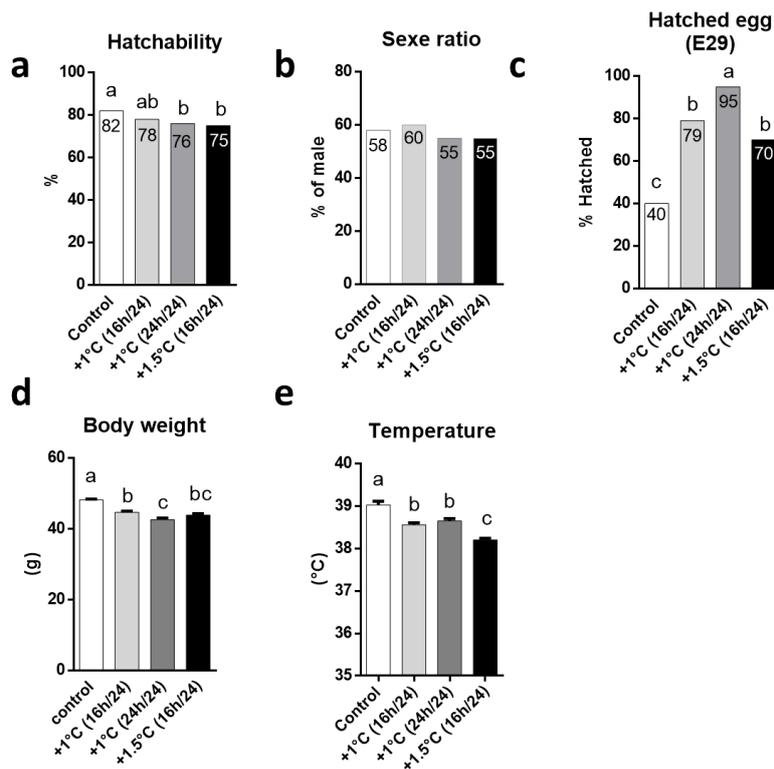
**Figure 1. Experimental design**

Control eggs were incubated in standard conditions (37.6°C and 47% relative humidity (RH)). Thermal manipulation (TM) conditions correspond to 38.6°C 16 h/d or 38.6°C 24h/d or 39.1°C 16 h/d with 63% RH from embryonic day E13 to E27.



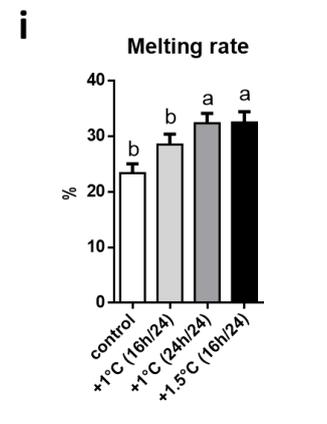
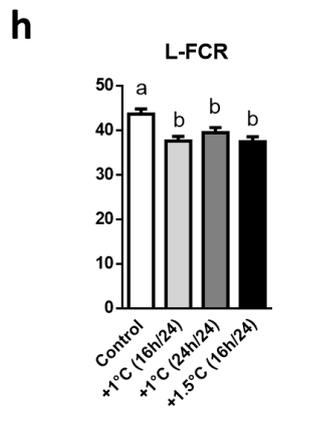
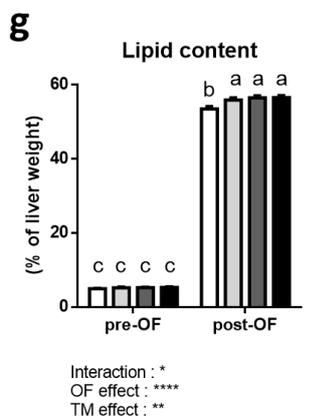
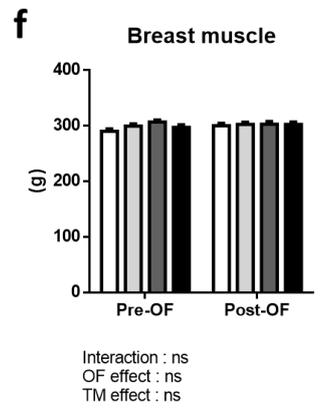
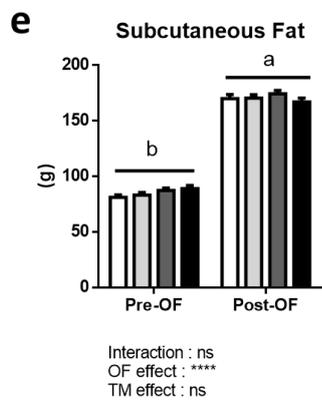
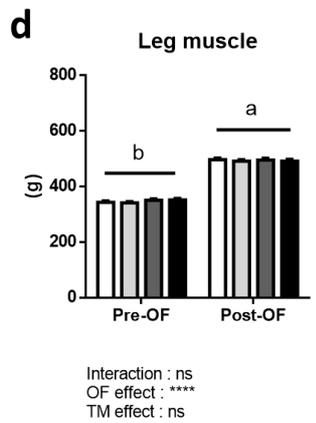
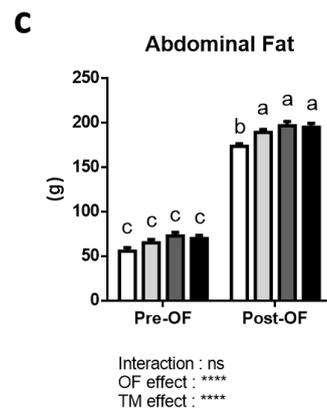
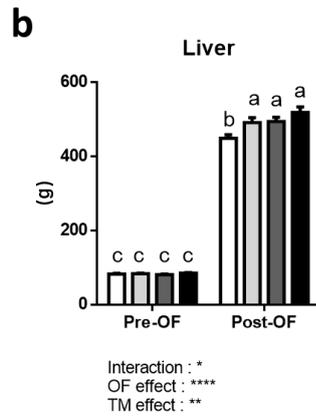
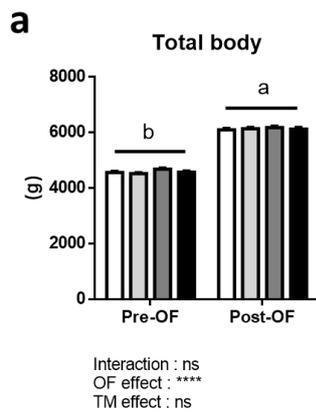
**Figure 2. Hatching data**

**a-c.** Percentage of total hatchability (a), sex ratio (b) and E29 hatched eggs (c) of mule eggs in control condition, or thermic manipulated conditions. **d-e.** Mean Body weight (d) and body surface temperature (e) of male mule duckling 1 day after hatching in control (white bar), +1°C 16h/24h (clear grey bar), +1°C 24h/24h (dark grey bar) and +1.5°C 16h/24h (black bar) groups. Chi<sup>2</sup> analysis between each group were used for hatchability (n=300-318) (a), sex ratio (b) and percentage of hatched eggs at E29 (n=224-262) (c). Kruskal-wallis with Dunn's multiple comparisons test were used for body weight (d) and temperature (e), n=124-15, presented with standard error of mean (SEM). Values without common letters were statistically different (P < 0.05).



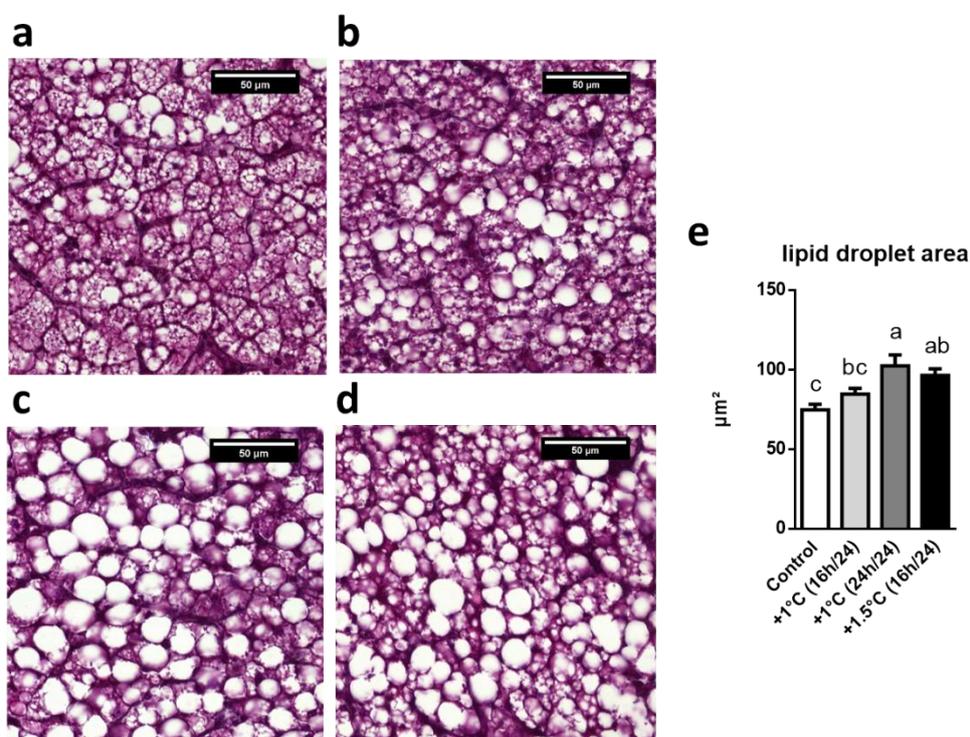
### Figure 3. Pre and post over-feeding data

**a-f.** Average weight of body (a), liver (b), abdominal fat (c), leg muscle (d), subcutaneous fat (e) and breast muscle (f) of male mule ducks at D84 pre-OF and D95 post-OF in control (white bar), +1°C 16h/24h (clear grey bar), +1°C 24h/24h (dark grey bar) and +1.5°C 16h/24h (black bar) groups. **g.** Estimated lipid content in liver of pre-OF (n=37-39) and post-OF (n=47-52) in control (white bar), +1°C 16h/24h (clear grey bar), +1°C 24h/24h (dark grey bar) and +1.5°C 16h/24h (black bar) groups, established as described in material and methods. Two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test were performed (a-g). n= 90-95 for pre-OF and n= 48-52 for post-OF (a), n= 36-38 for pre-OF and n=47-52 for post-OF (b,c,d,e,f,g). **h.** Liver-Food conversion ratio (LFCR) per bird was determined using the individual daily consumption and the liver weight gain during OF (measured using each group pre-OF average liver weight and post-OF individual liver weight). One-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test were performed (n=46-52). **i.** *Foie gras* melting rate in overfed male mule ducks in control, (white bar), +1°C 16h/24h (clear grey bar), +1°C 24h/24h (dark grey bar) and +1.5°C 16h/24h (black bar) groups (n=47-52). Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test were performed (n=47-52). All data are presented with SEM. \* = p<0.05; \*\* = p<0.01; \*\*\*\* = p<0.0001. Values without common letters were statistically different (P < 0.05), ns = non significant.



**Figure 4. Histological analysis**

**a-d.** Representative images of lipid droplet in the liver of the different groups: control (a), +1°C 16h/24h (b), +1°C 24h/24h (c) and +1.5°C 16h/24h (d) . Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ . **e.** Mean of lipid droplet area above 48  $\mu\text{m}^2$  of male mule ducks post-OF (n=14, the analysis was done on 2 different images of each sample for a total of 7 samples per group). Data are presented +/- SEM. One-way ANOVA (followed by Tuckey's multiple comparison test) was performed. Values without common letters were statistically different (P < 0.05).



## Impact d'une manipulation thermique embryonnaire sur l'expression de gènes hépatiques chez le canard mulard gavé

### Résumé

L'objectif de ce troisième article était d'identifier des gènes hépatiques spécifiquement modulés par la MT embryonnaire dans le foie des canards mulards présentant une amélioration de la production de foie gras. Pour cela, 15 et 20 échantillons de foie par groupe respectivement avant et après gavage ont été prélevés lors de l'expérimentation DuckProg.

Cette ébauche rassemble **les principaux résultats** obtenus sur l'expression des gènes impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique.

Dans cette étude nous avons observé et confirmé que la plupart des ARNm impliqués dans la synthèse des lipides (FAS, SCD1, DGAT2, GPAT1, ACLY et ACC) sont surexprimés après gavage. Ils sont associés à une augmentation de FABP4, et VLDLR qui sont impliqués dans le transport des lipides et favorisent le retour des lipides vers le foie. De plus, les gènes impliqués dans l'oxydation des lipides (LIPC, ACAD11 et Acox) sont principalement sous-exprimés après gavage.

Nous avons également mesuré une augmentation des gènes impliqués dans le transport des glucides (GLUT1, GLUT2 et GLUT3) ainsi que de leur oxydation (HK1, HK2, ENO1).

Globalement, l'impact de la MT sur l'expression des gènes du métabolisme après gavage est très limité. Toutefois, cette étude nous a permis d'identifier quelques cibles spécifiques du traitement comme GPAT1, ACAD ou LIPC.

### **Article 3: en préparation**

## **Impact of embryonic thermal manipulation in mule ducks on gene expression involved in metabolism**

William Massimino<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Aurélie Secula<sup>2</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>3</sup>, Tracy Pioche<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>, Mireille Morisson<sup>4</sup>, Anne Collin<sup>5</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>IHAP, Université de Toulouse, ENVT, INRA, UMR 1225, 31076 Toulouse, France

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

<sup>4</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Castanet Tolosan, France

<sup>5</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

Corresponding author: [marianne.houssier@univ-pau.fr](mailto:marianne.houssier@univ-pau.fr)

## **Abstract (150-250)**

The development of poultry embryos is easily affected by environmental factors, such as incubation temperature. Our team has recently demonstrated that embryonic thermal programming can significantly improve fatty liver production in three months old mule ducks. However, the mechanisms at the origin of this programming have not yet been characterized. In this study, we investigated the impact of this embryonic thermal programming on the expression of genes involved in lipid and carbohydrate metabolism, stress and thyroid hormone in ducks directly during the thermal manipulation and at 83 and 95 days of age, before and after overfeeding respectively.

The livers of 10 embryos and 15 and 20 male mule ducks were collected at the 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup> embryonic days, and before and after overfeeding respectively. Gene expressions analysis was performed on mRNA by fluidigm. First we confirmed the results of Tavernier et al., (2017) with an increase in genes implicated in lipid synthesis and transport after OF in connection with an increase in carbohydrate transport and oxidation gene expression. We also confirmed a potential increase in diet-induced thermogenesis with an increase in heat shock and thyroid-related genes involved in thermogenesis.

For the first time we explored the impact of thermal manipulation during embryogenesis on the liver after overfeeding at mRNA level in mule ducks and highlighted different expression patterns depending on the cellular pathway.

## **Introduction:**

Avian embryogenesis occurs outside the body and can be easily affected by environmental factors. Among the environmental factors that impact egg development, incubation temperature is recognized as one of the most important (DuRant et al., 2011; Li et al., 2017). In poultry, it is clear that slight changes in incubation temperature had profound impacts on phenotypes (Maltby et al., 2004; Loyau et al., 2014) and also caused prolonged effects on postnatal development (Piestun et al., 2009, 2013) on poultry. Indeed, the increase in incubation temperature during the development and maturation of the hypothalamus-hypophysis-thyroid axis has already been shown to improve thermotolerance of the broiler by reducing mortality by 50% during a subsequent heat challenge (Piestun et al., 2008). This was manifested by a drop in body temperature associated with a decrease in plasma content of triiodothyronine hormone (T3) from hatching until slaughter age (Loyau et al., 2013, 2015; Piestun et al., 2013). In a more interesting way, an increase of 1°C during the early stages of incubation also leads to more muscle fibers after hatching in turkey (Maltby et al., 2004) and an increase of 1.7°C 12h/day from embryonic day 7 (E7) to 16 (E16) (closed to 50% of the total incubation period) enhanced of 39 g the breast muscle weight in 70 days old broilers (Piestun et al., 2013). These results not only provide an interesting

potential gain, but also demonstrate that embryonic programming can affect animal physiology throughout its life.

In ducks, there is much less data on embryonic thermal manipulation (TM), but Durant *et al* (DuRant et al., 2013) have also demonstrated that the higher the incubation temperature the better the response to thermal stress, characterized by better maintenance of their comfort temperature after a cold challenge, few days after hatching. It has recently been shown in the Pekin ducklings that a continuous rise in incubation temperature of 1°C during embryonic period E11-E24 (closed to 50% of the total incubation period), resulted in an increase in liver weight at 2 weeks post-hatching (Liu et al., 2015) and an increase in the activity and expression of hepatic fatty acid synthase (FAS), a key enzyme of lipogenesis (Wang et al., 2014). These results suggest that embryonic TM in Pekin ducks could enhance lipid storage in the liver, at least in a short term.

That is why we have tested different embryonic TM in mule duck, which is a sterile hybrid mainly used for the production of “foie gras” in France. This hybrid results from a crossbreeding between a Muscovy male and a Pekin female. This crossbreeding obtained by artificial insemination has improved the resistance of the animals, their capacity of overfeeding, and the high grade of fatty liver (Larzul et al., 2006; Marie-Etancelin et al., 2008; Drouilhet et al., 2014). For fatty liver producers, the main criteria of quality are weight, texture and melting rate, which is an indicator of technological performance (Theron et al., 2012; Awde et al., 2015). To produce fatty liver, male ducks are subjected to a 9 to 12 days period of overfeeding (OF) where high amounts of corn are ingested twice a day. This high carbohydrate diet highly stimulates the hepatic *de novo* lipogenesis and induces liver steatosis (Mourot et al., 2000; Chartrin et al., 2006; Saez et al., 2008; Hérault et al., 2009; Tavernier et al., 2017), characterized by a huge expansion of lipid content, ranging from 5% in lean animal to 50-60% in overfed animals (Hermier et al., 2003).

In this study, we designed three embryonic TM with different increase of the incubation temperature during the second part of embryogenesis. Actually, we have recently demonstrated that these conditions increase liver weight and fattening in overfed mule ducks at the age of three months (Massimino 2019, submitted). However, this embryonic programming has thus proved to be highly reproducible both in positive and undesirable effects. Indeed, despite a faster development observed for all treated ducks, a slight but significant reduction of hatching rate (75% and 76% compared to 82% in control group) and a loss of product quality reflected by an increase in melting rate after cooking (>30%) was revealed for the two most intense conditions (+1°C 24h/24 and +1.5°C 16h/24). Interestingly, these two identical phenotypes result from the exact same cumulative temperature rise of +332°C, applied throughout the second half of embryogenesis, suggesting that the embryonic thermal stimulus should not exceed this threshold. This trial also shown a strict positive impact of a cumulative rise in temperature of 224°C, corresponding to the group +1°C 16h/24 which allowed the same increase in fatty liver production as the other TM groups without any negative impact on hatchability or melting rate. These results

indicate that programmed fatty liver production by embryonic thermal manipulation could be precisely optimized by fine modulation of the thermal stimulus during embryogenesis.

In this context, we investigated the impact of TM applied during embryogenesis in mule duck on the expression of genes involved in metabolism before and after overfeeding. Increased de novo lipogenesis is known as one major cause of hepatic steatosis and is linked to overexpression of lipogenic genes (Lavoie and Gauthier, 2006; Parekh and Anania, 2007; Ferré and Foufelle, 2010). In addition, hepatic steatosis is also linked to increased FA uptake, decreased FA-oxidation and/or decreased synthesis or secretion of very low density lipoproteins (VLDLs) (Musso et al., 2009; Fabbrini et al., 2010). In order to understand the molecular mechanisms involved in increasing liver weight and lipid levels after OF and following an embryonic TM, we analyzed the expression of genes involved in the metabolisms of lipids, carbohydrates, stress and thyroid hormones. This may allow us to understand the mechanisms involved in the embryonic TM on “foie gras” production.

### Materials and methods

A total of 2,000 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 four treatment groups (500 eggs each, in four incubators). Control group was maintained at 37.6°C and 47% average relative humidity (RH) during the whole incubation period. Thermal manipulations (TM) occurred during the last 14 days of incubation period, *i.e* embryonic day 13 to 27 (E13-E27) at 38.6°C, 24h/day (+1°C 24h/24), 38.6°C 16h/day (+1°C 16h/24), and 39.1°C 16h/day (+1.5°C 16h/24) (Figure 1), RH being adjusted to an average of 63% for all manipulated groups in order to avoid egg dehydration. These increases in incubation temperature correspond to a cumulative heating of 336°C for the first and third TM groups (1°C\*24h\*14days and 1.5°C\*16h\*14days) and 224°C for the second group (1°C\*16h\*14days), compared to control group.

All eggs were turned through 90° every 3 hours. In each incubator, temperature and hygrometry were continuously measured by a sensor equipped with remote probes (KIMO). Unfertilized eggs were excluded by candling at E10, with a sliding of remaining eggs to prevent local temperature disturbance caused by the appearance of hole. At E27, all eggs were placed in the same hatcher at 37.3°C and 80% of RH. Newly hatched ducks were recorded every day from E27 to E31.

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 (2800 Kcal, crude protein 17.5%). From 4 to 8 weeks of age, ducklings were fed *ad libitum* with a growing diet (2800 Kcal, crude protein 15.5%), and hourly rationed between 8 and 12 weeks of age. At 12 weeks, all ducks were overfed with corn meal twice a day (53% corn and 47% water, Palma Maisadour), for 11 days (21 meals). Ducks were killed in line with the European Council regulation (“Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killingText with EEA relevance,”) at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France).

### Samples collections and plasma analyses

At days 17, 83 and 95 post-hatching, 10, 15 and 20 males per group, respectively, were randomly selected and 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. 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 with Take3 Plate, and all the samples were normalized at 500 ng/  $\mu$ l. The integrity of total RNA was analyzed by electrophoresis. For the RT-PCR, an amount of 3ng RNA was reverse transcribed to cDNA with Iscript Reverse Transcription Supermix for RTqPCR (Bio-Rad, USA) with duplicates of samples. The absence of DNA contamination was prevented by DNase treatment. Reverse transcription reaction was done in CFX384 (Bio-Rad, USA) according to this program: 25 °C/5 min, 46 °C/20 min, 95 °C/1 min.

### qPCR EvaGreen using BioMark

The mRNA levels of 81 genes coding for proteins involved in lipid and carbohydrate metabolisms, stress and thyroid hormone pathway were quantified. The primer sequences used in the qPCR assays was created first by aligning the protein sequences of human, mouse and duck (*Anas platyrhynchos*) on MultAlin (Corpus, 1988) to identify the best-preserved exon. These exons are then treated on Primer3 (Koressaar and Mmer, 2007; Untergasser et al., 2012) to build specific primers. Then they were validated on a concentration range of cDNA pool. Before performing Fluidigm step, a specific target amplification (STA) has been done with 5 ng/ $\mu$ l of cDNA (n=20 RNA samples per treatment). This step consists in PCR using PreAmp Master Mix and specific primer in order to normalize all samples and to ensure that there is 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 96x96 chip for Fluidigm Gene Expression Array. The primers were provided by Applied Biosystems and were used at a concentration of 100  $\mu$ M. Primer sequences are presented in Table 1. The reaction was made thanks to 20X 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 analysed 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 and cDNA). This part of the work was performed at the platform of quantitative transcriptomic GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France).

### Gene expression analysis

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. The 6 housekeeping genes for the relative quantification of mRNA levels of target genes were USP9X, Actine $\beta$ , EIF3, STAB1, HPRT1 and Luciferase. Luciferase is an exogenous RNA (Promega), added to each sample during the reverse transcription (100 pg per inch) to allow normalization of the data as previously described (Desvignes et al., 2011; Marandel et al., 2012). 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 1.90 and 2. The analyzes were done with RStudio and results were expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001, Pfaffl 2004) with

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{RQ_{\text{target}}}{\text{geomean}(RQ_{\text{references}})}$$

$$RQ = \frac{2^{\Delta Ct_{\text{target}}}}{(2^{\Delta Ct_{\text{USP9X}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{Actine}\beta}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{EIF3}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{STAB1}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{HPRT1}}} \times 2^{\Delta Ct_{\text{luciferase}}})^{\frac{1}{6}}}$$

$$\Delta Ct_{\text{target}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{sample}}$$

$$\Delta Ct_{\text{ref}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{sample}}$$

$$Ct_{\text{control}} = \text{average Ct of all samples}$$

### Statistical analysis

Statistical analyses were done using the Graphpad Prism v6 software. When data set presented a Normal distribution (assessed by Shapiro–Wilk test), parametric variance analysis (ANOVA) was performed followed by a Dunnett's multiple comparison test as post hoc analysis. When normal distribution was not demonstrated, Kruskal–Wallis non-parametric test was performed followed by a Dunn's test as post hoc analysis. The data are presented as the average  $\pm$  standard deviation (SD). In every case, differences between the groups were considered statistically significant if the value of  $P < 0.05$ . The heatmap.2 function from gplots package was used to draw heatmaps with RStudio. The **corrplot** package was used to draw correlation matrix, this package contains algorithms to reordering matrix according to the degree of correlation between the variables.

## **Results and discussion**

### Gene expressions related to lipids

The expression profiles of genes related to lipid before and after overfeeding are presented in figure 1, figure 2, and figure 3. As demonstrated by the heatmaps related to lipid synthesis (fig.1a)

and lipid oxidation (fig.1b) strong upward and downward modulations respectively are induced by force-feeding. First, we can see an increase in the expression of genes implicated in lipid synthesis like FAS, SCD1 and DGAT2, as already demonstrated by Hérault et al 2010 and Tavernier et al. 2018. In addition, we measured a significant increase of ACLY, ACC, ELOVL6 and GPAT1 after OF, all involved and essential for lipid synthesis, and a decrease in ACAA2, ACAD11, ACOX, LIPC and ACSL1 related in lipid. These results confirmed the strong influence of OF in hepatic de novo lipogenesis in mule ducks.

Furthermore, even if TM significantly affects only a few gene expressions, a significant increase of GPAT1 is observed after overfeeding for two TM groups (+1°C 16h/day and 24h/day) compared to control. Remembering that all these conditions of TM induced an increase in liver lipid content (Massimino 2019, submitted), it is of particular interest to identify specific TM target genes with substantial role in lipogenesis. Moreover, ACSS1, involved in fatty acid activation before beta-oxidation, is specifically decreased in all TM groups, suggesting that embryonic programming may promote storage of lipids in the liver by also partially reducing lipid catabolism. This finding could help to improve the method (by targeting the embryonic period with a high expression of these genes) but also to understand the underlying mechanisms (by looking for epigenetic marks affecting their expressions).

With regard to gene expressions related to lipid transport (fig 3), we can notice a strong increase in FABP4 level and a decrease of APOB and LDLR in all groups after OF. These observations are in accordance with previous results in overfed ducks (Tavernier et al 2018), and data on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in human (Nakamuta et al., 2009). Interestingly, the decrease in LDLR expression observed between before and after OF is higher in TM groups than in control, suggesting that reducing cholesterol transport during OF could be of interest to improve fattening of the liver. We can assume that the reduction of this pathway could lead to a reorientation of lipid anabolism to a better storage of triglycerides, but no additional evidence was observed in this study to confirm this hypothesis.

The +1°C 24h/day TM group presents a particular profile, since we measure a significant increase of ELOVL6, ACLY and CEPT1 and significant decrease of SOAT and ACSS1 before OF compare to all other groups in the same stage. As we did not measure any particular phenotype at this stage (neither on the liver weight nor on the lipid content), it is difficult to understand and explain this strong impact on mRNA expression.

#### Gene expressions related to carbohydrates

Figures 4 and 5 reveal the expression patterns of carbohydrate-related genes before and after overfeeding.

As shown in the graph parts (fig.4b), we measured an increase in the expression of GLUT1, GLUT2 and GLUT3 at the end of the OF in all groups. These proteins belong to the large family of glucose transporters and passively transport the glucose and other hexoses in several tissues (Zhao and

Keating, 2007). These results confirm that the high amount of glucose delivered during 11 days has to be absorbed and managed by the liver, as previously shown (Tavernier 2019 in press). However, SGLT1, as an active co-transporter of sodium and glucose, seems not strongly impacted by OF in the liver. His extremely high affinity (Zhao and Keating, 2007) is probably sufficient to assume the transport through hepatocyte membrane during this period.

Despite the application of the TM during maximal embryonic expression of these genes (Massimino 2019), no TM effect was measured after OF, at least 10h after the last meal. Indeed, a recent study measuring the kinetics of gene expressions after the last meal of OF had previously shown that maximal expression of glucose transporters occurred approximately 2h after the last (Annabelle et al., 2017). It is therefore not excluded that embryonic TM may have an impact on these expressions and activities after OF, but it would be necessary to carry out new experiments, with earlier slaughter to answer this question.

As for glucose transport, OF increased the pathway of carbohydrates degradation for most of the genes we measured (fig.5) as previously shown (Tavernier et al., 2017). Only GAPDH, involved in several different pathways is downregulated by OF. However, these measurements did not reveal any potent effect of TM.

## Conclusion

The metabolic pathways leading to the development of hepatic steatosis are multiple with an increase in the *de novo* synthesis of fatty acids (lipogenesis) and a decreased of  $\beta$ -oxidation (Postic and Girard, 2008). An increase in lipid synthesis was confirmed in this study with an overexpression after overfeeding of FAS, SCD1, DGAT2, GPAT1, ACLY and ACC. All these genes are implicated in lipid synthesis associated with an increase of FABP4, OSBP3 and VLDLR which are implicated in lipid transport that ameliorate certainly lipid accumulation in the liver like in NAFLD. Associated with this overexpression we have a decrease of gene implicated in lipid oxidation, LIPC, ACAD11 and Acox. There are multiple metabolic pathway leading to the development of hepatic steatosis, the under expression in gene lipid oxidation and the overexpression of gene implicated in lipid synthesis are part of it. These results are in accordance with the pathway of hepatic steatosis (Postic and Girard, 2008).

Ducks were fed with a high carbohydrate diet almost exclusively composed of corn. Lipogenesis is defined as the synthesis of fatty acids from nonlipid precursors. It is a pathway for metabolism of excess carbohydrate and is activated by high carbohydrate availability. It is therefore normal to observe an increase in carbohydrate transport (GLUT1, GLUT2 and GLUT3) or oxidation (HK1, HK2, ENO1).

Thermal manipulation seems to impact much more the group +1°C 24h/day than the other 2 TM groups before overfeeding. An interesting result is the increase of GPAT1 in TM groups after overfeeding, which catalyze glycerolipid synthesis, which may correspond to the increase of the

lipid level in the liver. GPAT put aside there is no big impact of MT after overfeeding for genes analyzed in this study.

We have identified a very interesting target gene of thermal manipulation as the GPAT1 gene. Other differences might have been identified if the samples had been taken more quickly after the last meal here they were done 10 hours later but generally the peak of gene expression implicated in lipid and carbohydrate metabolism is between 2 and 5 hour after the last meal. In this direction, greater differences in gene expression after overfeeding would probably have been observed with samples taken 3 hours after the last meal either for the overfeeding effect or for the thermal manipulation effect.

## References

- Annabelle, T., R. Karine, B. Marie-Dominique, D. Stéphane, and G. Karine. 2017. Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Mol Cell Biochem* 430:127–137.
- Awde, S., N. Marty-Gasset, G. Sandri, A. D. Zotte, and H. Réminon. 2015. Effect of different chilling rates on the quality parameters of mule duck fatty liver. *Poultry Science* 94:3015–3024.
- Chartrin, P., M.-D. Bernadet, G. Guy, J. Mourot, J.-F. Hocquette, N. Rideau, M. J. Duclos, and E. Baéza. 2006. Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145:390–396.
- Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killingText with EEA relevance. :30.
- Drouilhet, L., B. Basso, M.-D. Bernadet, A. Cornuez, L. Bodin, I. David, and C. Marie-Etancelin. 2014. Improving residual feed intake of mule progeny of Muscovy ducks: Genetic parameters and responses to selection with emphasis on carcass composition and fatty liver quality. *Journal of animal science* 92:4287–4296.
- DuRant, S. E., W. A. Hopkins, A. W. Carter, C. M. Stachowiak, and G. R. Hepp. 2013. Incubation Conditions Are More Important in Determining Early Thermoregulatory Ability than Posthatch Resource Conditions in a Precocial Bird. *Physiological and Biochemical Zoology* 86:410–420.
- DuRant, S. E., W. A. Hopkins, and G. R. Hepp. 2011. Embryonic Developmental Patterns and Energy Expenditure Are Affected by Incubation Temperature in Wood Ducks ( *Aix sponsa* ). *Physiological and Biochemical Zoology* 84:451–457.
- Fabbrini, E., S. Sullivan, and S. Klein. 2010. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51:679–689.
- Ferré, P., and F. Fofelle. 2010. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12:83–92.

- Hérault, F., G. Saez, E. Robert, A. Al Mohammad, S. Davail, P. Chartrin, E. BaÃ©za, and C. Diot. 2009. Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Animal Genetics* 41:12–20.
- Hermier, D., G. Guy, S. Guillaumin, S. Davail, J.-M. André, and R. Hoo-Paris. 2003. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135:663–675.
- Larzul, C., B. Imbert, M.-D. Bernadet, G. Guy, and H. Rémignon. 2006. Meat quality in an intergeneric factorial crossbreeding between muscovy ( *Cairina moschata* ) and Pekin ( *Anas platyrhynchos* ) ducks. *Animal Research* 55:219–229.
- Lavoie, J.-M., and M.-S. Gauthier. 2006. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63:1393–1409.
- Li, X., J. Qiu, H. Liu, Y. Wang, J. Hu, X. Gan, and J. Wang. 2017. Long-term thermal manipulation in the late incubation period can inhibit breast muscle development by activating endoplasmic reticulum stress in duck ( *Anas platyrhynchos domestica* ). *Journal of Thermal Biology* 70:37–45.
- Liu, H., J. Liu, X. Yan, Q. Li, Y. Zhao, Y. Wang, R. Zhang, G. Wang, H. Wang, X. Li, C. Yang, L. Li, C. Han, and J. Wang. 2015. Impact of thermal stress during incubation on gene expression in embryonic muscle of Peking ducks (*Anas platyrhynchos domestica*). *Journal of Thermal Biology* 53:80–89.
- Loyau, T., L. Bedrani, C. Berri, S. Métayer-Coustard, C. Praud, V. Coustham, S. Mignon-Grasteau, M. J. Duclos, S. Tesseraud, N. Rideau, C. Hennequet-Antier, N. Everaert, S. Yahav, and A. Collin. 2015. Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: a review. *Animal* 9:76–85.
- Loyau, T., C. Berri, L. Bedrani, S. Métayer-Coustard, C. Praud, M. J. Duclos, S. Tesseraud, N. Rideau, N. Everaert, S. Yahav, and others. 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. *Journal of animal science* 91:3674–3685.
- Loyau, T., S. Métayer-Coustard, C. Berri, S. Crochet, E. Cailleau-Audouin, M. Sannier, P. Chartrin, C. Praud, C. Hennequet-Antier, N. Rideau, N. Couroussé, S. Mignon-Grasteau, N. Everaert, M. J. Duclos, S. Yahav, S. Tesseraud, and A. Collin. 2014. Thermal Manipulation during Embryogenesis Has Long-Term Effects on Muscle and Liver Metabolism in Fast-Growing Chickens (S-B Wu, Ed.). *PLoS ONE* 9:e105339.
- Maltby, V., A. Somaiya, N. A. French, and N. C. Stickland. 2004. *In ovo* temperature manipulation influences post-hatch muscle growth in the turkey. *British Poultry Science* 45:491–498.
- Marie-Etancelin, C., H. Chapuis, J. M. Brun, C. Larzul, M. M. Mialon-Richard, and R. Rouvier. 2008. Genetics and selection of mule ducks in France: a review. *World's Poultry Science Journal* 64:187–208.
- Mourot, J., G. Guy, S. Lagarrigue, P. Peiniau, and D. Hermier. 2000. Role of hepatic lipogenesis in the susceptibility to fatty liver in the goose (*Anser anser*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 126:81–87.

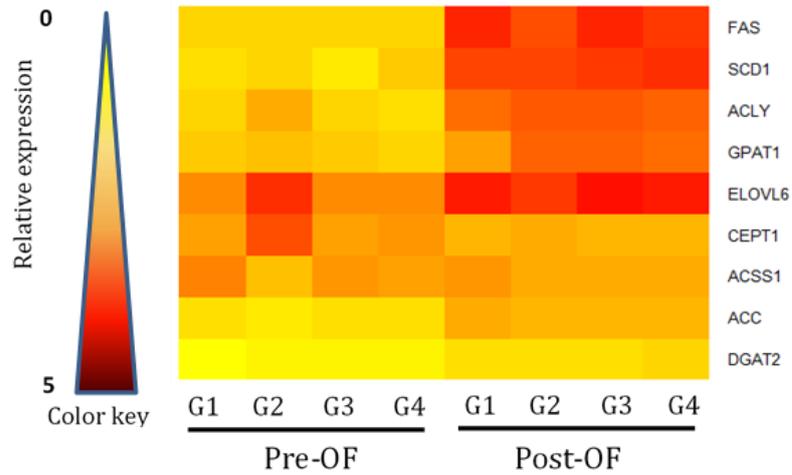
- Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader. 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research* 48:1–26.
- Parekh, S., and F. A. Anania. 2007. Abnormal Lipid and Glucose Metabolism in Obesity: Implications for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 132:2191–2207.
- Piestun, Y., S. Druyan, J. Brake, and S. Yahav. 2013. Thermal manipulations during broiler incubation alter performance of broilers to 70 days of age. *Poultry Science* 92:1155–1163.
- Piestun, Y., M. Harel, M. Barak, S. Yahav, and O. Halevy. 2009. Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects on myoblast proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology* 106:233–240.
- Piestun, Y., D. Shinder, M. Ruzal, O. Halevy, J. Brake, and S. Yahav. 2008. Thermal Manipulations During Broiler Embryogenesis: Effect on the Acquisition of Thermotolerance. *Poultry Science* 87:1516–1525.
- Postic, C., and J. Girard. 2008. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes & Metabolism* 34:643–648.
- Saez, G., E. Baéza, S. Davail, D. Durand, D. Bauchart, and D. Gruffat. 2008. Is the hepatic metabolism of glucose and linoleic acid influenced by species in overfed ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151:576–581.
- Tavernier, A., S. Davail, K. Ricaud, M.-D. Bernadet, and K. Gontier. 2017. Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 424:147–161.
- Theron, L., M. Cullere, M. Bouillier-Oudot, H. Manse, A. Dalle Zotte, C. Molette, X. Fernandez, and Z. G. Vitezica. 2012. Modeling the relationships between quality and biochemical composition of fatty liver in mule ducks. *Journal of Animal Science* 90:3312–3317.
- Wang, G., J. Liu, S. Xiang, X. Yan, Q. Li, C. Cui, L. Li, and H. Liu. 2014. Influence of in ovo thermal manipulation on lipid metabolism in embryonic duck liver. *Journal of Thermal Biology* 43:40–45.
- Zhao, F.-Q., and A. Keating. 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *CG* 8:113–128.

## Figures and legends

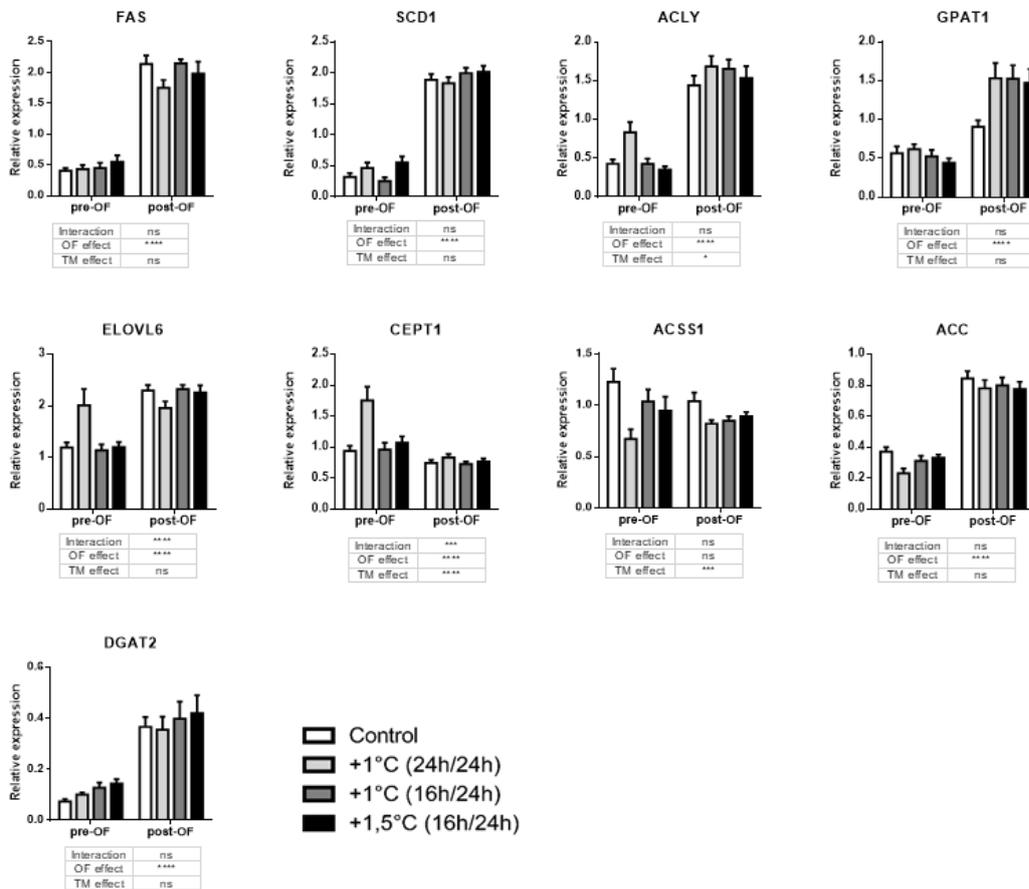
### Figure 1. Relative hepatic expression of lipid synthesis genes

1. Heatmap illustrating hepatic gene expressions at different stages in mule ducks. Low gene expression is shown in yellow, while high expression is in red, according to the color key.
2. Expression profile of FAS, SCD1, ACLY, GPAT1, ELOVL6, CEPT1, ACSS1, ACC and DGAT2 in the liver of mule ducks. Data are presented with (SEM).

1.



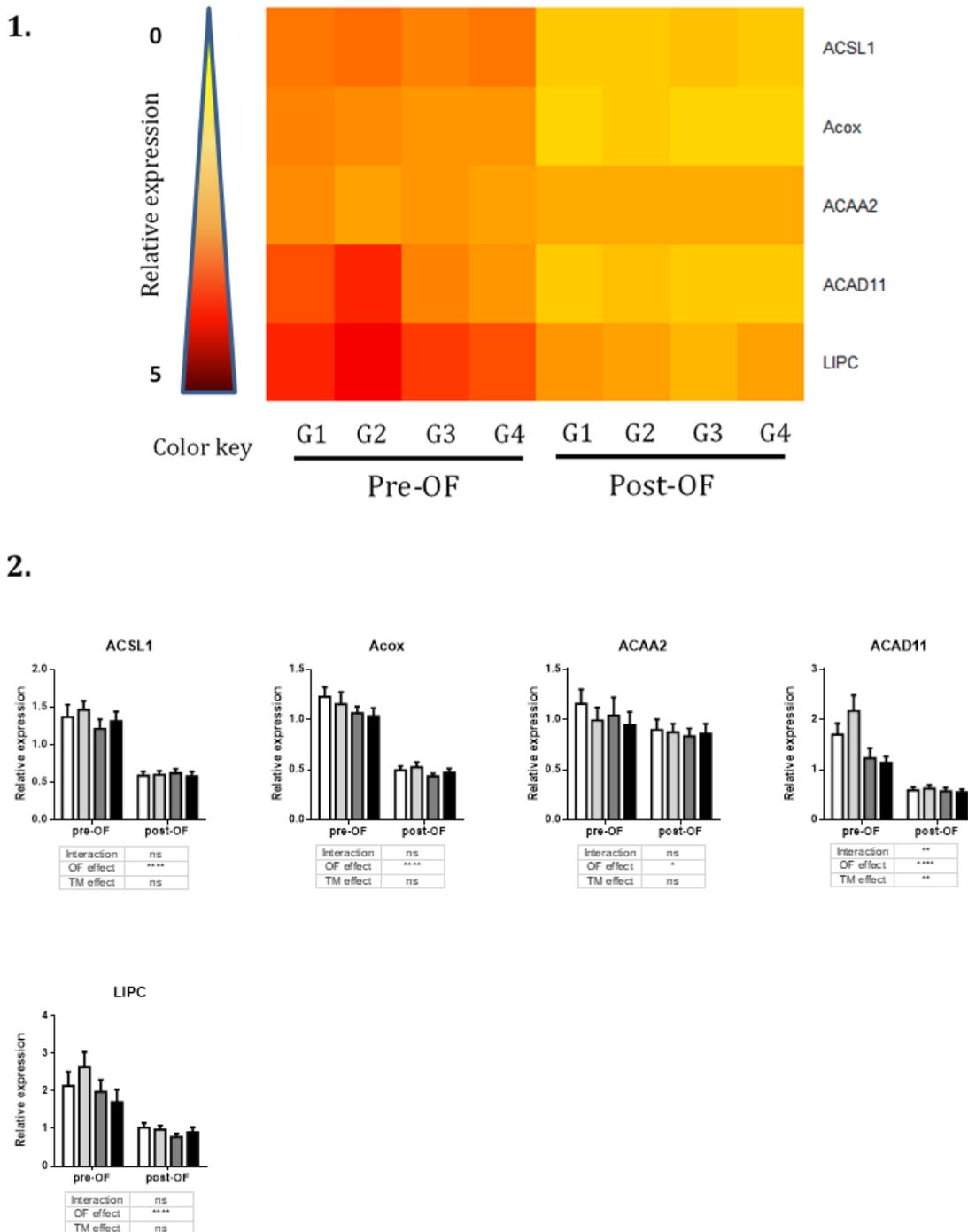
2.



**Figure 2. Relative hepatic expression of lipid oxydation genes**

1. Heatmap illustrating hepatic gene expressions before and after overfeeding in mule ducks. Low gene expression is shown in yellow, while high expression is in red, according to the color key.

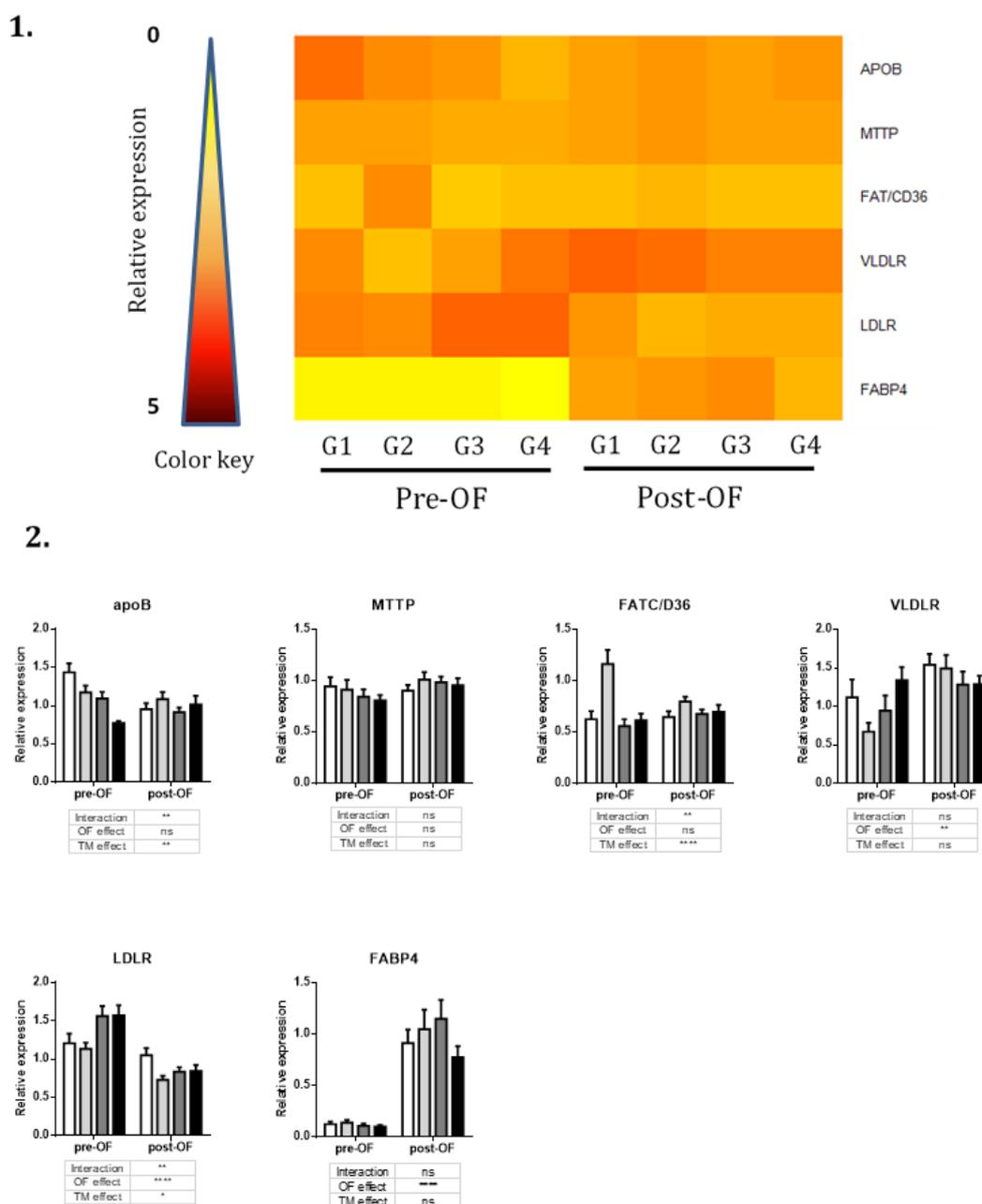
2. Expression profile of ACSL1, Acox, ACAA2, ACAD11 and LIPC in the liver of mule ducks. Data are presented with (SEM).



**Figure 3. Relative hepatic expression of Lipid transport genes**

1. Heatmap illustrating hepatic gene expressions before and after overfeeding in mule ducks. Low gene expression is shown in yellow, while high expression is in red, according to the color key.

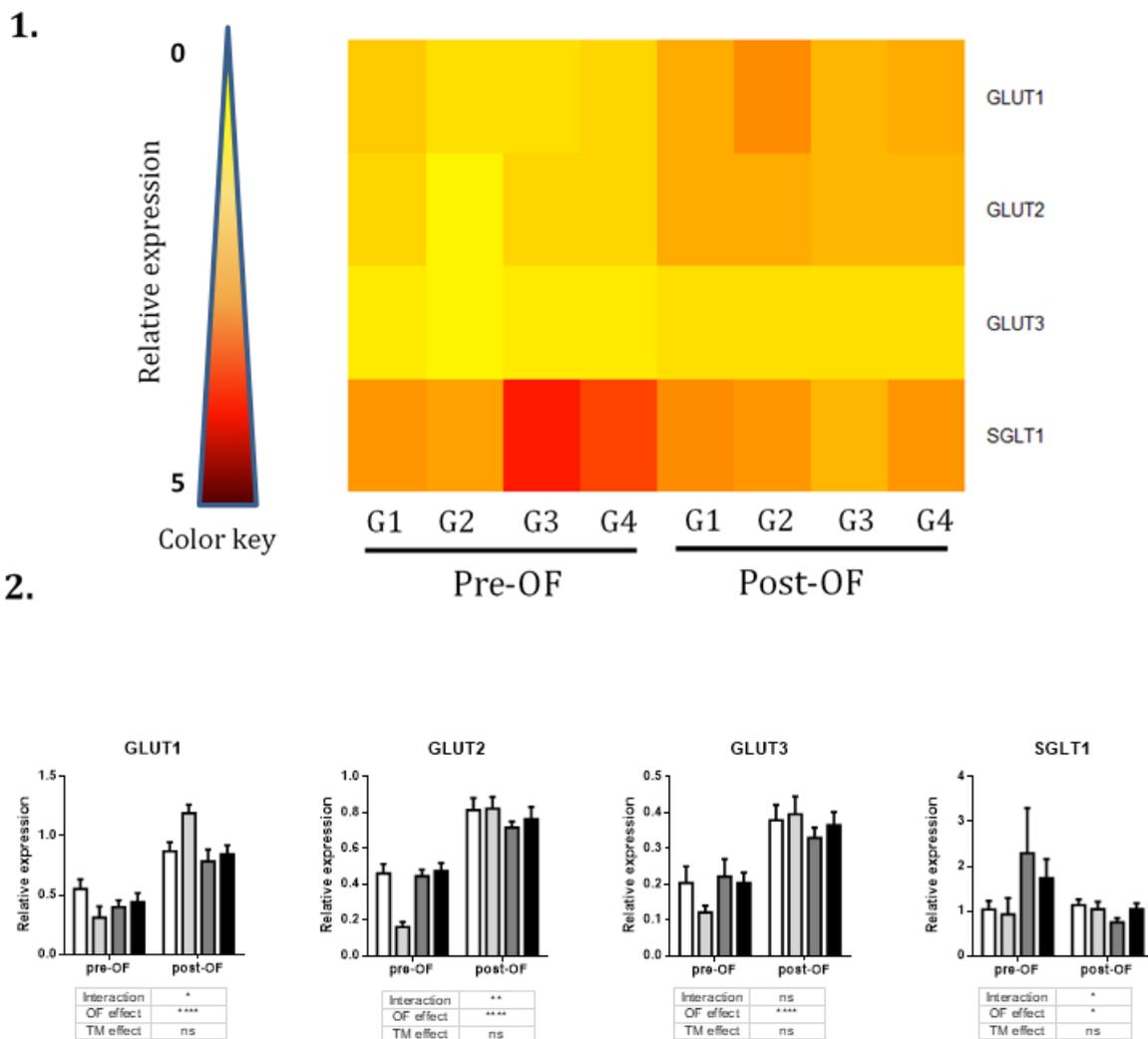
2. Expression profile of apoB, MTTP, FAT/CD36, VLDLR, LDLR and FABP4 in the liver of mule ducks. Data are presented with (SEM).



**Figure 4. Relative hepatic expression of carbohydrate transport related genes**

1. Heatmap illustrating hepatic gene expressions before and after overfeeding in mule ducks. Low gene expression is shown in yellow, while high expression is in red, according to the color key.

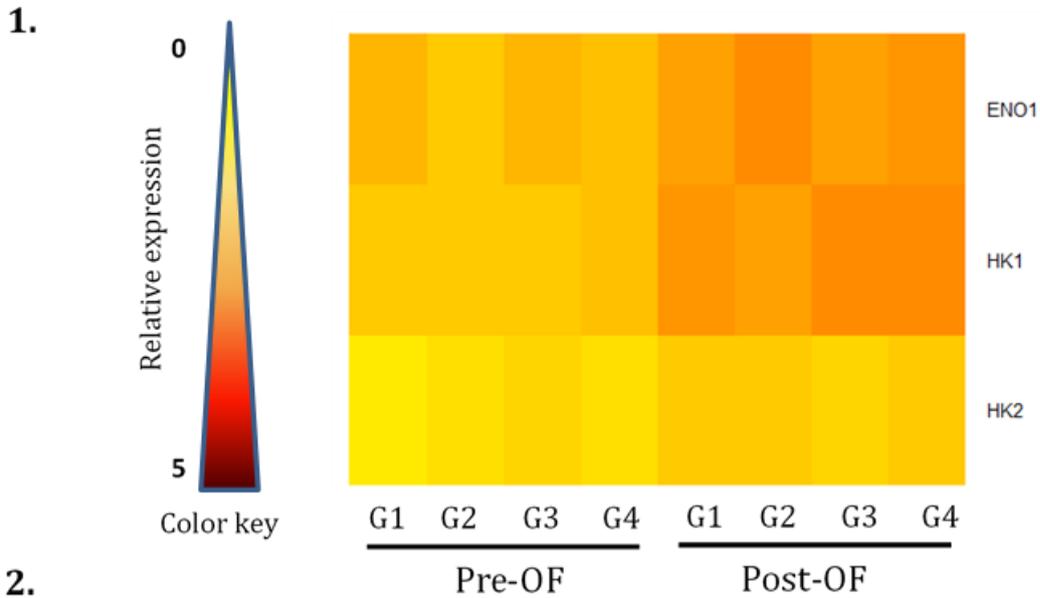
2. Expression profile of GLUT1, GLUT2, GLUT3 and SGLT1 in the liver of mule ducks. Data are presented with (SEM).



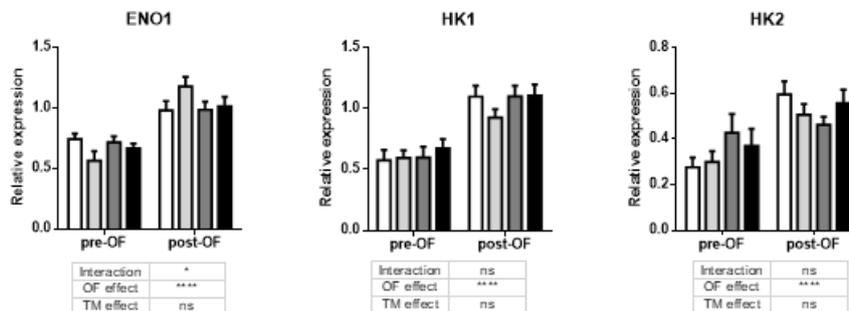
**Figure 5. Relative hepatic expression of carbohydrate oxydation related genes**

1. Heatmap illustrating hepatic gene expressions before and after overfeeding in mule ducks. Low gene expression is shown in yellow, while high expression is in red, according to the color key.

2. Expression profile of ENO1, HK1, HK2 in the liver of mule ducks. Data are presented with (SEM).



2.



## **Discussion générale**

Ce travail de thèse avait pour but de caractériser les effets de manipulations thermiques embryonnaires chez le canard mulard, dans le contexte de la production de foie gras. Cette étude visait à déterminer les différents impacts sur la physiologie et le métabolisme hépatique tout au long de la vie du canard mulard, par une approche intégrative, exploitant différents champs d'investigation de la physiologie à la biologie moléculaire.

Dans un premier temps, nous souhaitions décrire l'ontogenèse du métabolisme hépatique chez cette espèce, dans le but de mettre en évidence de potentielles fenêtres de programmation, caractérisées par une grande plasticité. Pour cela, nous avons donc menée une première expérience « ontoDuck » dans laquelle nous avons mesuré l'expression d'un large panel de gènes impliqués dans différentes voies métaboliques pouvant jouer un rôle dans la mise en place de la stéatose hépatique.

Au cours de cette expérience, des échantillons de foie ont été prélevés tous les 4 jours depuis le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E12) jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour après l'éclosion (J4). Nous avons ensuite analysé l'expression de 50 gènes d'intérêt, mettant en évidence un pic d'expression pour de nombreux gènes impliqués dans les métabolismes glucidique et lipidique autour du jour embryonnaire E20.

Pour répondre à notre second objectif, nous avons ensuite conçu une nouvelle expérimentation (DuckProg) au cours de laquelle nous avons pu tester 3 conditions de manipulations thermiques (MT) embryonnaires. Les résultats de l'étude OntoDuck n'ayant pas encore été analysés, nous nous sommes appuyés sur différentes études effectuées chez le poulet et le canard pekin. Ayant à notre disposition 4 incubateurs, nous avons la possibilité de mettre en incubation 1 groupe contrôle (37,6°C tout au long de la période d'incubation), et 3 groupes « tests ». Une étude bibliographique approfondie nous a d'abord permis de déterminer la **période** pendant laquelle nous souhaitons appliquer notre stimulus thermique. En effet, les MT ayant menées à une amélioration de la thermorégulation chez le poulet recouvraient la période de mise en place du système régulateur hypothalamo-hypophyso-thyroidien (Piestun et al., 2008c; Collin et al., 2011), soit environ 50% du temps total d'incubation, au cours de la seconde moitié de l'embryogenèse (Piestun et al., 2008a, 2013). Chez le canard Pekin également les deux études ayant montré un potentiel impact sur le métabolisme hépatique à court terme (15 jours post-éclosion) appliquaient le stimulus thermique tout au long de la seconde moitié de l'embryogenèse (Wang et al., 2014; Liu et al., 2015b). Nous avons donc décidé

d'appliquer notre stimulus thermique au cours de la seconde moitié de la période d'incubation du canard mulard, soit de E13 à E27. Il nous a fallu ensuite déterminer la **température** à laquelle stimuler nos embryons, en essayant de limiter les risques de mortalité embryonnaire. Chez le poulet, deux études semblaient montrer qu'une hausse de température (+1.7°C) de façon continue (24h/24h) pendant toute la durée du stimulus augmentait le risque de mortalité embryonnaire, alors qu'une hausse discontinue (12h/24h) permettait de protéger les embryons (Piestun et al., 2008b; a). Chez le canard Pekin au contraire, l'application d'une hausse de température de façon continue, n'entraînait pas de mortalité embryonnaire (Wang et al., 2014), mais la hausse de température était moindre que celle testée chez les poulets (+1°C). Nous avons donc décidé de tester chez nos canards mulards une hausse de température de **+1°C** de façon **continue** (24h/24h) et **discontinue** (16h/24h pour des raisons pratiques, les incubateurs n'étant pas programmables), et un troisième groupe avec une hausse un peu plus élevée de température, **+1,5°C** de façon **discontinue** afin d'augmenter le challenge chez les canards, tout en tentant de préserver l'éclosabilité. Pour tous nos groupes « tests » l'hygrométrie a également été augmentée à 63% (vs 47% chez les contrôles) dans le but de préserver l'éclosabilité.

Les résultats de cette étude ont montré que les manipulations thermiques embryonnaires entraînent des modifications physiologiques sur le long terme qui pourraient contribuer à une meilleure production de foie gras chez le canard mulard. Cependant, deux des groupes MT, présentaient une baisse d'éclosabilité et un taux de fonte lipidique à la cuisson plus élevé. Ceci laisse penser qu'une optimisation de la manipulation thermique embryonnaire pourrait être envisagée pour améliorer la qualité du foie gras, notamment en choisissant une MT modérée et discontinue.

Enfin, la troisième étude avait pour objectif d'identifier les gènes dont l'expression était spécifiquement modulée par la MT embryonnaire, au moment du gavage. Pour cela, nous avons prélevé lors de l'étude DuckProg, des échantillons de foie avant et après gavage chez nos animaux programmés. Sur ces échantillons, nous avons analysé l'expression des gènes d'intérêt, impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique pouvant jouer un rôle dans la stéatose hépatique induite par le gavage. Cette étude nous a permis d'identifier plusieurs gènes spécifiquement modulés par la MT et pouvant expliquer l'augmentation de l'engraissement du foie observée.

## **Cinétique d'expression des gènes hépatiques pendant l'embryogenèse du canard mulard**

Avec cette étude nous souhaitons décrire pour la première fois au niveau moléculaire l'ontogenèse du métabolisme hépatique chez le canard mulard. L'objectif était de trouver de potentielles fenêtres de programmation, caractérisées par une forte plasticité et pouvant impacter le métabolisme hépatique sur le long terme. Nous avons donc mesuré l'expression de gènes impliqués dans les différentes voies métaboliques jouant un rôle dans l'engraissement du foie lors du gavage, ou dans le développement et la différenciation des cellules hépatiques au cours du développement.

Dans cet article, les expressions sont représentées sous deux formes différentes pour faciliter la compréhension globale des résultats. D'abord une carte de couleur (heatmap) permet de mettre en relief de façon rapide les différences d'expression (jaune pour faible, rouge pour forte) de tous les gènes au cours du temps, et ensuite des graphiques permettent de détailler le profil d'expression de chaque gène au cours du temps.

Sur la première heatmap, représentant les expressions relatives des gènes liés au développement hépatique, nous pouvons distinguer deux voire trois parties distinctes. D'abord la grande majorité de ces gènes est fortement exprimée sur la première partie de la cinétique, entre E12 et E20. Ensuite, le niveau d'expression le plus faible apparaît principalement le premier jour après l'éclosion (J1), avant une légère augmentation observée pour la plupart des gènes le 4ème jour après l'éclosion (J4). La plupart de ces gènes sont impliqués dans les processus de prolifération cellulaire (IGF1, FGFR2), de différenciation (PROX1, Nr5a2) et du développement du foie (GATA6, HGF, PROX1). Comme la taille des foies ne permettait pas l'échantillonnage avant E12, il est impossible de conclure sur l'expression spécifiquement hépatique de ces gènes du développement avant ce stade. Cependant, les données sur l'embryogenèse précoce du poulet suggèrent que l'induction hépatique de l'endoderme antérieur via une interaction avec le mésoderme « cardiaque » (Fukuda-Taira, 1981) implique plusieurs de ces voies dès le début de l'ontogenèse (Jung et al., 1999; Zaret, 2002; Suksaweang et al., 2004b). Néanmoins, bien qu'une grande partie de la prolifération cellulaire et de la différenciation hépatique survienne aux premiers stades du développement du foie (Suksaweang et al., 2004a), nos résultats suggèrent que ces voies de signalisation sont toujours fortement impliquées entre

E12 et E20, dans des foies morphogénétiquement distincts. Par conséquent, comme il a déjà été démontré qu'un stimulus thermique pouvait augmenter la prolifération et le nombre final de cellules musculaires chez le poulet (Halevy et al., 2001; Piestun et al., 2011), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une légère hausse de température pendant cette période pourrait affecter le nombre de cellules du foie chez les canards.

Par conséquent, même si l'hyperplasie ne semble pas être impliquée dans l'hypertrophie du foie lors du gavage (BENARD et al., 2006), il est envisageable qu'une augmentation du nombre d'hépatocytes à la naissance puisse améliorer la croissance du foie pendant le gavage, puisque la faculté de chaque cellule à s'élargir (hyperphagie) ne devrait pas être affectée. De plus, des études récentes (Theron et al., 2011; Massimino and Houssier, 2019) suggèrent que la structure histologique du foie après suralimentation, en particulier le nombre et la taille des gouttelettes lipidiques, pourrait jouer un rôle dans la qualité finale du produit, principalement déterminée par la fonte lipidique après la cuisson. Il serait donc très intéressant de déterminer l'impact précis du stimulus thermique embryonnaire sur le nombre de cellules hépatiques pendant le développement embryonnaire et après suralimentation afin de moduler avec précision le rendement final en foie gras par un protocole de programmation adapté.

Concernant le métabolisme glucidique l'expression la plus faible apparaît à J1, tandis que le niveau d'ARNm est significativement plus élevé entre E12 et E20 par rapport à la fin de cinétique pour la plupart des gènes. Néanmoins, comparé aux gènes liés au développement, le pic principal semble être plus serré autour de E20. Seul le facteur de transcription ChREBP semble décalé dans le temps avec un pic à E28 et un creux au tout début de la cinétique. Les gènes impliqués dans le transport du glucose (GLUT1, GLUT2) ou de la glycolyse (GAPDH, HK1) sont principalement exprimés au début de la cinétique, l'expression maximale se produisant principalement à E20.

Chez les ovipares, la nutrition de l'embryon en développement dépend entièrement des ressources en jaune et en albumine présents dans l'œuf. Malgré la faible teneur en glucides de l'œuf (Thommes and Just, 1964; Yadgary et al., 2010b; Nangsuay et al., 2015; Quan and Benjakul, 2019), la glycolyse a été décrite comme une source d'énergie extrêmement importante au cours du premier tiers de l'embryogenèse du poulet (Moran, 2007) ainsi qu'à l'éclosion (Freeman, 1969). Nos résultats soulignent que l'expression de

gènes liés aux glucides est fortement engagée jusqu'à E20 dans les embryons de canard mulard, confirmant le rôle majeur du foie dans l'homéostasie systémique du glucose tout au long de l'embryogenèse (Ballard and Oliver, 1963; Yarnell et al., 1966; Yadgary and Uni, 2012). Enfin, la baisse de l'expression des gènes liés aux glucides observée à J1 pourrait refléter le déclin des ressources endogènes lors du processus d'éclosion qui est un processus à forte demande énergétique.

Concernant le métabolisme lipidique une coupe nette apparaît à J4 sur la heatmap pour tous les gènes par rapport au reste de la cinétique, à l'exception de DGAT2 qui présente un profil proche de celui des gènes liés au métabolisme glucidique. Ce changement global important intervenant le 4<sup>ème</sup> jour après la naissance suggère que, contrairement aux gènes impliqués dans le métabolisme des glucides, l'expression des gènes liés aux lipides pourrait être fortement affectée par les premiers repas. En effet, les canetons échantillonnés à J1 ont été abattus avant le premier repas, tandis que les canetons échantillonnés à J4 ont tous été nourris *ad libitum* depuis le 2<sup>ème</sup> jour post éclosion.

L'utilisation des lipides du jaune au cours du développement de l'embryon aviaire a déjà été décrit (Speake et al., 1998a), ces lipides constituant la principale source d'énergie au cours de la dernière semaine d'embryogenèse, lorsque les embryons présentent une croissance exponentielle (Noble and Cocchi, 1990; Moran, 2007). Par conséquent, le régime de départ, composé principalement de blé et de maïs, peut être interprété comme une transition nutritionnelle puisque les canetons passent d'une source d'énergie composée principalement de lipides du jaune d'œuf à un régime exogène riche en glucides (Noy and Sklan, 1999). Cette phase de transition cruciale s'accompagne également d'un changement majeur dans le métabolisme du foie, qui acquiert la capacité de synthétiser ses propres lipides (Noble and Ogunyemi, 1989). Nos résultats, comme les études précédentes sur le poulet (Richards et al., 2010; Cogburn et al., 2018), illustrent cette modification du métabolisme lipidique hépatique en mettant en évidence la forte augmentation de l'expression de gènes lipogéniques tels que SCD1 ou FAS à J4 chez les canetons mulards. Ces gènes sont impliqués dans la voie de la lipogenèse *de novo* (Clarke, 1993; ALJohani et al., 2017) qui reflète la capacité de stockage des glucides sous forme de lipides (Sanders and Griffin, 2016). Dans un contexte de changement nutritionnel avec un apport soudainement élevé en glucides, il est logique de stimuler leur stockage

en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des lipides, le foie étant le site principal de la lipogenèse chez les oiseaux (Leveille et al., 1975a; Ding et al., 2012).

Cependant, nous pouvons observer que la voie du catabolisme lipidique est également toujours active à J4, avec une expression élevée de Acox1, ACAD11, ACAA2, CPT1A, suggérant que le métabolisme énergétique ne se concentre pas totalement sur les glucides à ce stade chez les canards mulards.

Enfin, plusieurs gènes principalement impliqués dans le catabolisme des lipides (ACAA2, FAT / CD36, GPAT1, CPT1A, PPARA) présentent également une expression élevée au début de la cinétique, entre E12 et E20. La bêta-oxydation des acides gras fournissant une grande partie de la demande en énergie pendant l'embryogenèse (Speake et al., 1998a), une modification de leur régulation ou de leur activité par une MT au cours de cette période pourrait induire des effets à long terme sur le métabolisme lipidique.

Grâce à une matrice de corrélation nous avons noté un lien négatif important entre un groupe de gènes liés aux glucides et un second groupe lié aux lipides. En effet, Acox, SCD1, FAS, LDLR4, ACLY et CEPT1 apparaissent fortement corrélés négativement à DGAT2, GAPDH, GLUT2, Aldh3a2, GLUT1, ACSS1 et HK1. Ces résultats suggèrent que ces deux voies, qui semblent fonctionner en miroir au cours du développement (Speake et al., 1998a; Moran, 2007), pourraient être affectées différemment par les programmations en début de vie.

Pour les gènes impliqués dans le stress la heatmap souligne un pic d'expression après la naissance pour la plupart des gènes, en particulier le 4<sup>ème</sup> jour post éclosion. Cette augmentation globale de l'expression se produit après le transfert des canetons de l'éclosoir au bâtiment d'élevage, entraînant un changement de température important de 37,3 °C à 26-28 °C. Il est intéressant de noter qu'un changement de la température ambiante induit une augmentation significative de l'expression hépatique de gènes thermosensibles impliqués dans le repliement des protéines. Si le stimulus thermique appliqué lors de l'embryogenèse induisait une modification directe de leur expression, il pourrait être intéressant de les utiliser en tant que marqueurs positifs de la stimulation. Les produits de ces gènes étant impliqués dans le repliement de différents types de protéines, une modification de leurs profils d'expression pourrait avoir un impact sur plusieurs

activités enzymatiques, même celles impliquées dans les processus métaboliques. Une prochaine étude se concentrera sur l'impact immédiat du changement thermique au cours de l'embryogenèse sur le niveau d'expression de ces gènes.

Le processus d'éclosion représente un défi majeur en termes de régulation nutritionnelle, de contrôle de la température corporelle, mais également de transition de la respiration chorioallantoïque à la respiration pulmonaire (Speake et al., 1998b; Cogburn et al., 2018). Ce changement métabolique brutal avec l'apparition soudaine de niveaux élevés d'oxygène peut entraîner une augmentation du stress oxydatif qui doit être contrôlé pour maintenir l'homéostasie cellulaire globale. L'expression accrue de plusieurs gènes impliqués dans la détoxification cellulaire, tels que GSTK1, GSTT1 ou CYP2E1 dans le foie de canetons nouveau-nés peut-être un reflet de ce système de contrôle.

Enfin, ces modèles d'expression confirment que l'éclosion est certainement le défi le plus brutal auquel un oiseau soit confronté tout au long de sa vie et suggèrent que le stimulus thermique embryonnaire pourrait être spécifiquement tracé par certains de ces marqueurs biologiques liés au stress.

### **Amélioration de la production de foie gras chez le canard mulard après une manipulation thermique embryonnaire**

Le second article publié dans *Frontiers in Physiology* en 2019 s'est appuyé sur l'observation des effets de plusieurs manipulations thermiques embryonnaires chez le canard mulard. L'utilisation d'un stimulus au cours d'une période de développement, qui se situe souvent au cours de l'embryogenèse, a déjà été caractérisée comme pouvant potentiellement conduire à un changement phénotypique majeur en réponse à un challenge spécifique rencontré plus tard dans la vie. Ce processus appelé "programmation" peut avoir des résultats intéressants en termes de santé animale et peut même être à l'origine de bénéfices commerciaux pour l'industrie agroalimentaire. L'exposition d'embryons de volaille à de légères hausses de températures d'incubation améliore leur capacité de survie lors de pics de chaleur à l'âge adulte. Récemment, il a été démontré que la manipulation thermique (MT) embryonnaire avait un impact sur le développement musculaire et le métabolisme hépatique chez les canards Pékin. Dans

cette première étude nous avons utilisé 3 manipulations thermiques embryonnaires différentes. Les conditions d'incubation des 4 groupes expérimentaux ont été :

- un groupe contrôle incubé à 37,6°C, avec une hygrométrie constante (47%) pendant toute la durée d'incubation
- un groupe incubé à 38,6 °C de façon continue (+1°C 24h/24) de E13 à E27
- un groupe incubé à 38,6°C de façon discontinue (+1°C 16h/24) de E13 à E27
- et groupe incubé à 39,1°C de façon discontinue (+1,5°C 16h/24h) de E13 à E27

L'hygrométrie des 3 groupes MT a été ajustée à 63%.

Lors de la période d'incubation, l'humidité relative est une caractéristique importante, puisqu'une perte en eau trop importante de l'œuf peut entraîner une déshydratation (Noiva et al., 2014). L'humidité peut également augmenter la capacité de transfert de chaleur de l'environnement vers l'œuf (Molenaar et al., 2010). Nous avons donc ajusté à la hausse l'humidité relative dans nos 3 groupes traités par rapport au groupe contrôle pour éviter toute déshydratation et donc mort potentielle au cours de l'incubation. Malgré cela, nous avons observé une diminution significative du taux d'éclosion pour les 2 groupes ayant subi les plus fortes manipulations thermiques passant de 82% pour les contrôles à 76% et 75% pour les groupes +1°C 24h/24 et +1,5°C 16h/24. En revanche nous n'observons pas de diminution significative dans le groupe +1°C 16h/24. Il est intéressant de noter que les deux premiers groupes ont été exposés exactement au même cumul de température (+ 336 °C par rapport aux contrôles), tandis que le dernier groupe n'a été exposé qu'à un cumul de température de +224°C sur la totalité de l'incubation par rapport aux contrôles. Ces résultats confirment des données obtenues chez les poulets (Piestun et al., 2008b) indiquant qu'une augmentation continue de la température d'incubation affecte plus fortement l'éclosabilité qu'une augmentation discontinue, et suggèrent que les canards seraient plus sensibles à une hausse modérée de température continue. Globalement, l'impact de la MT embryonnaire sur l'éclosabilité reste controversé en fonction de la variation de température, de la période et de la durée du traitement thermique (Piestun et al., 2008a; Loyau et al., 2013; Nariç et al., 2016; Al-Rukibat et al., 2017), certaines études montrant même une éclosabilité plus élevée chez les animaux traités avec une augmentation de température. En outre, la plupart des études précédentes ont été réalisées chez le poulet, laissant ouverte l'idée que des espèces distinctes pourraient réagir différemment à la MT. Dans notre étude, même si 2 des 3 groupes MT présentent

une diminution significative du taux d'éclosion comparés aux contrôles, il est intéressant de noter que ce taux reste dans l'intervalle classiquement mesuré chez les canards mulards entre 70% et 80% (Marie-Etancelin et al., 2008; Liu et al., 2015b). Ces données montrent donc que l'éclosabilité reste un point sensible lors d'une MT, mais suggèrent que ce facteur pourrait être maîtrisé par une mise au point affinée du protocole.

D'autre part, une éclosion précoce a été observée chez tous les animaux ayant subi une manipulation thermique embryonnaire par rapport au groupe contrôle. Ces résultats confirment les données antérieures montrant que l'augmentation de la température d'incubation accélère le développement embryonnaire principalement par l'utilisation plus rapide des nutriments et de l'énergie du jaune et de l'albumen (DuRant et al., 2011, 2012, 2013b; Hepp and Kennamer, 2012; Noiva et al., 2014). En ce qui concerne le sex-ratio, aucune différence n'est observée entre les MT et le groupe contrôle, la MT ne change donc pas le déséquilibre en faveur des mâles induit par le croisement inter génétique, qui est principalement due à une augmentation de mortalité chez les femelles (Batellier et al., 2004). Des diminutions significatives du poids corporel et de la température de surface corporelle ont été observées à l'éclosion pour les 3 groupes MT par rapport au groupe témoin. Ces différences de poids et de température entre les groupes MT et contrôles ont souvent été observées chez le poulet ou la dinde à l'éclosion (Piestun et al., 2008b; Loyau et al., 2013; Al-Zghoul et al., 2015a; Al-Rukibat et al., 2017). La diminution de température de surface corporelle chez les canards MT nous conforte dans le fait que la « programmation » a bien fonctionné, puisqu'elle confirme les résultats obtenus dans de nombreuses études chez les poulets, relevant une baisse moyenne de température corporelle de 0,2°C jusqu'à 28 jours post-éclosion (Loyau et al., 2015). La diminution de poids corporel à l'éclosion est probablement dû au développement accéléré des groupes MT entraînant leur éclosion précoce qui a introduit un décalage d'alimentation par rapport au groupe contrôle et donc une perte de poids corporel. Toutefois, les canards MT ont rattrapé leur retard de poids 17 jours après l'éclosion par rapport au groupe contrôle et à ce stade, aucune différence n'est observée au niveau du poids de foie, de la graisse abdominale et des muscles de la cuisse.

Les hormones thyroïdienne T3 et T4 participent à la régulation de la production de chaleur et donc à l'acquisition de la thermotolérance chez la volaille. Dans notre expérience, la MT embryonnaire n'a pas modifié les concentrations plasmatiques de T3 et de T4 chez les

canetons à l'âge de deux semaines (données non montrées). Ces résultats sont conformes à ceux d'une étude antérieure chez le poulet (Piestun et al., 2008a) et suggèrent que l'activité de l'axe de la thyroïde n'est pas fortement modifiée en l'absence de choc thermique ultérieur, même si les températures corporelles ont été réduites pendant plusieurs semaines par rapport au contrôle.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une forte baisse du niveau plasmatique de corticostérone dans les trois groupes MT chez le caneton mulard à l'âge de 2 semaines comparés au groupe contrôle (données non publiées). Ces résultats sont en accord avec Piestun et al. (Piestun et al., 2009) qui avaient précédemment démontré une diminution de la teneur plasmatique en corticostérone chez des embryons de poulet soumis à une augmentation de 1,7 °C de E7 à E16, suggérant une régulation négative des fonctions surrénaliennes. Comme précédemment expliqué dans la partie bibliographie, cet axe joue un rôle important dans la régulation du métabolisme glucidique (les glucocorticoïdes sont des hormones hyperglycémiantes) et lipidique (activation de la lipolyse). Une diminution de ces hormones suggère que le métabolisme serait impacté par une MT embryonnaire, au moins jusque 17 jours post-éclosion. Toutefois, aucune modification du taux de glucose ou de lipides circulants n'a pu être mesurée à ce stade (données non publiées) ni après gavage chez les animaux traités. Le taux de corticostérone plasmatique quant à lui revient à un niveau semblable au groupe contrôle à l'âge de 83 jours et après gavage, laissant supposer que l'impact sur le métabolisme médié par l'axe cortico-surrénalien après une MT embryonnaire n'est pas maintenu dans le temps. De nouveau, Il serait intéressant de tester des modulations de température ambiante pendant la phase de gavage, afin de voir si la programmation thermique embryonnaire a pu avoir un impact sur la réaction des animaux face à un stress thermique lors d'une suractivation du métabolisme énergétique.

Le but de cet essai était d'évaluer l'engraissement du foie chez des canards mulards adultes gavés, préalablement traités avec trois types de MT embryonnaires. Les quatre groupes ont été soumis aux mêmes conditions de gavage pendant 11 jours (21 repas) à l'âge de 12 semaines (84 jours). En fin de gavage, plus aucune différence de température de surface corporelle n'est observée.

L'impact d'un régime riche en glucose sur le métabolisme est très important et a été montré comme pouvant induire une augmentation de la thermogénèse (Curcio et al., 1999;

Marques-Lopes et al., 2003). Nos résultats confirment l'activation de l'axe thyroïdien, impliqué dans la thermogénèse (Guémené et al., 2006), démontré par une hausse significative de la T3 avec une légère baisse de T4 dans tous les groupes après gavage. Comme la teneur plasmatique de T3 (forme active) peut résulter à la fois de la sécrétion thyroïdienne et de la désiodation périphérique de T4 (Pittman et al., 1971; Surks et al., 1973), il n'est donc pas surprenant de voir une diminution de T4 en parallèle avec une hausse de T3. Chez l'homme et les rongeurs, on sait depuis longtemps que la production de T3 est stimulée par la suralimentation (Danforth et al., 1979; Katzeff, 1990), censée être à l'origine d'une augmentation de la dépense énergétique par la thermogénèse afin de limiter la prise de poids (Acheson et al., 1984; Stock, 1989). Dans cette étude, on pouvait s'attendre à ce que la MT affecte la thermogénèse induite par le gavage, mais dans nos conditions, aucun effet de la MT n'a été révélé sur les concentrations de T3 et de T4 par rapport au groupe témoin, malgré quelques légères variations entre les sous-groupes de MT. Cependant, le groupe MT +1°C 24h/24h présentait une diminution significative du rapport T3/T4 après gavage par rapport au groupe témoin, suggérant une activité plus faible de l'axe de la thyroïde pouvant entraîner une diminution de la thermogénèse. Dans ces conditions, le gavage pourrait être considéré comme un challenge thermique et nous aurions pu nous attendre à une stimulation de l'axe thyroïdien moins importante chez nos groupes MT. Cependant, aucun effet de la MT embryonnaire n'a été mesuré sur le taux plasmatique des hormones thyroïdiennes, soulignant peut-être la limite de la mesure de la température de surface, par rapport à une mesure de la température interne. Toutefois, il serait désormais intéressant de mesurer l'impact de la MT à la fois sur la température corporelle des animaux traités comparés au contrôles, mais également de mesurer la réponse au gavage en conditions de températures estivales, lorsque la capacité de thermorégulation est mise à l'épreuve. Généralement réduite pendant cette période, la production de foie gras pourrait par ce biais être améliorée.

Comme attendu, le gavage induit une prise de poids significative pour le gras abdominal, la cuisse et le foie, dans les quatre groupes. De façon plus intéressante, la manipulation thermique embryonnaire augmente significativement le poids de gras abdominal mais surtout le poids des foies pour les 3 groupes MT par rapport au groupe contrôle, jusqu'à +16,9% pour le groupe +1.5°C 16h/24h. Cette augmentation est corrélée à une augmentation du contenu lipidique dans les trois groupes MT (+2,5 à 3%) la technique

semble donc être reproductible. Ces résultats suggèrent qu'une modification de la température d'incubation pendant l'embryogenèse pourrait moduler le métabolisme lipidique chez le canard mulard adulte, ouvrant la voie à une nouvelle procédure simple et peu coûteuse pour la filière de production de foie gras. L'engraissement du foie est cependant associé à un taux de fonte lipidique à la cuisson plus élevé dans les deux groupes traités avec le même cumul de température (+336°C). Ceci laisse penser qu'une optimisation de la manipulation thermique embryonnaire pourrait être envisagée pour améliorer la qualité du foie gras, notamment en choisissant une MT modérée et discontinue.

Nous avons aussi évalué l'impact de la MT embryonnaire sur les concentrations de métabolites plasmatiques chez les canards mulards. Etant donné que chez les canards Pékin soumis à une MT embryonnaire, il a été montré une augmentation du taux de cholestérol plasmatique deux semaines après l'éclosion (Wang et al., 2014) ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'engraissement du foie (Hermier et al., 2003) nous pensions observer des différences au niveau des métabolites issus du métabolisme lipidique et glucidique (glucose, tryglycéride, AGL, cholestérol) après gavage. Néanmoins, même si le gavage augmente fortement la teneur plasmatique en glucose, TG et cholestérol, comme observé précédemment (Davail et al., 2003; Hermier et al., 2003; Chartrin et al., 2006; Marie-Etancelin et al., 2011), aucun effet des MTs n'a été mesuré sur ces variables, que ce soit avant ou après gavage. Ces données suggèrent à nouveau que la température embryonnaire n'a pas d'impact sur les paramètres métaboliques plasmatiques en l'absence de choc thermique supplémentaire.

Cependant, le gavage induit une forte diminution de la teneur en corticostérone dans le plasma des canards mulards dans tous les groupes gavés par rapport aux animaux avant gavage. La corticostérone pouvant refléter la réponse au stress (Harvey et al., 1980), ces résultats sont cohérents avec ceux d'une étude précédente sur des canards mulards gavés, qui montre une habitude de la contrainte physique pendant le gavage (Guémené et al., 2006). En revanche, aucun effet de la MT sur la corticostérone n'a été mesuré à ce stade.

De plus, des analyses histologiques ont également permis de conclure que la MT embryonnaire pourrait modifier le type d'engraissement hépatique au cours du gavage,

puisque nous avons mesuré une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques dans les groupes qui ont un taux de fonte lipidique élevé, confirmant les résultats précédents de Theron et al. 2011. À l'avenir, il pourrait être intéressant d'examiner ces modifications en profondeur afin de conclure sur un lien potentiel entre l'augmentation de taille des gouttelettes lipidiques et la fonte du foie gras à la cuisson. Des mécanismes métaboliques différentiels peuvent être impliqués tels que l'hyperplasie ou l'hypertrophie cellulaire, des analyses d'activités enzymatiques impliquées dans la formation des gouttelettes lipidiques nous permettraient de confirmer un lien potentiel.

Il est particulièrement intéressant de noter que les deux conditions de MT les plus fortes (+1°C 24h/24h et +1,5°C 16h/24h), correspondant à la même augmentation de température cumulée (+336 °C sur la période de programmation) ont conduit à un même phénotype en terme d'éclosabilité, de surface des gouttelettes lipidiques et de fonte lipidique du foie à la cuisson. Ces résultats suggèrent que la production de foie gras pourrait être optimisée de manière extrêmement fine par une manipulation thermique embryonnaire et que la hausse de température cumulative ne devrait probablement pas atteindre ni dépasser 336 °C même si d'autres tests sont nécessaires pour déterminer une limite à ne pas dépasser. Une connaissance précise du métabolisme des lipides et des glucides au cours de l'embryogenèse pourrait également être utile pour choisir la meilleure période de « programmation » au cours de laquelle nous pourrions moduler la durée et le niveau de changement de température sans atteindre ce seuil. En effet, cet essai a montré l'impact positif strict d'une élévation de température cumulative de 224 °C, correspondant au groupe +1°C 16h/24h, qui permet une augmentation de production de foie gras similaire aux autres groupes MTs sans impact négatif sur l'éclosion ou le taux de fonte. Ces résultats offrent de nombreuses opportunités pour améliorer la production de foie gras.

### **Impact des manipulations thermiques embryonnaires sur l'expression de gènes hépatiques chez le canard mulard avant et après gavage**

Dans cette étude, nous avons débuté l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt dans le foie de canard mulard ayant subi une manipulation thermique embryonnaire dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la stéatose hépatique après gavage. Nous avons présenté les principaux résultats obtenus sur l'expression des gènes impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique. Les échantillons de foie

utilisés pour cette étude ont été prélevés à J83 (avant gavage) et J95 (après gavage) lors de l'expérimentation de manipulations thermiques embryonnaires du premier article.

Les profils d'expression des gènes du métabolisme des lipides ont été analysés tout d'abord à l'aide d'une heatmap. Cette représentation permet de mettre rapidement en évidence une surexpression des gènes impliqués dans la synthèse des lipides ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes liés à leur oxydation après gavage.

Nous avons confirmé une augmentation significative de FAS, SCD1 et DGAT2 après gavage comme déjà observé par (Hérault et al., 2009; Annabelle et al., 2018). Nous avons aussi montré une augmentation de l'expression de 4 autres gènes après gavage impliqués dans la synthèse des lipides (ACLY, ACC, ELOVL6 et GPAT1). De façon intéressante, seul GPAT1 est impacté significativement par la manipulation thermique embryonnaire après gavage pour 2 des 3 groupes qui ont subi la MT. GPAT1 permet la formation de triglycérides qui constituent la majorité des lipides stockés lors de la stéatose (>95%) (Fernandez et al., 2011) par la création d'une liaison ester entre un alcool et un acide gras. GPAT1 a donc un rôle majeur dans le processus de stéatose hépatique et donc dans la production de foie gras.

Des prélèvements plus tôt de nos échantillons après le dernier repas auraient certainement permis d'observer un plus grand nombre de gènes impactés par le gavage mais peut-être aussi par nos MT, car il a été montré que l'expression des ARNm présente un pic autour de 2-3h après le gavage (Tavernier et al., 2017b). Nos prélèvements ayant été effectués 10h après le dernier repas, l'expression mesurée ici représente donc une expression stabilisée, bien après le pic observé 2h après le dernier repas. Toutefois, les différences attribuées à la MT et observées dans ces conditions sont donc probablement les plus stables. Il aurait pu être intéressant de comparer les impacts de la MT sur l'expression des gènes du métabolisme sur différents points après le dernier repas, afin de vérifier l'ensemble de l'effet MT après gavage. Ce genre d'étude pourrait être envisagé prochainement.

Une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des lipides a aussi été observée (ACAA2, ACAD11, Acox, LPC et ACSL1). De nouveau, ACSS1, impliqué dans l'activation des acides gras avant la bêta-oxydation, est spécifiquement diminué dans tous les groupes TM. Ces résultats suggèrent que la MT embryonnaire pourrait favoriser

le stockage des lipides dans le foie en réduisant aussi partiellement le catabolisme lipidique.

Ces découvertes pourraient nous permettre d'améliorer la méthode par un ciblage précis de la période embryonnaire avec une expression élevée de ces gènes. Ceci pourrait également nous permettre de comprendre les mécanismes sous-jacents (en recherchant des marques épigénétiques affectant leurs expressions par exemple).

En ce qui concerne les expressions géniques liées au transport des lipides, on peut noter une forte augmentation du niveau de FABP4 et une diminution de l'APOB et du LDLR dans tous les groupes après gavage. Ces observations sont conformes aux résultats précédents concernant des canards gavés (Annabelle et al., 2018) ainsi qu'à des données sur la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) chez l'homme (Nakamuta et al., 2009).

La diminution du LDLR avant et après gavage est plus importante pour les groupes MT que pour les témoins, ce qui suggère une baisse du transport du cholestérol pendant le gavage qui pourrait être intéressante dans le but d'améliorer le développement du foie. Il est probable que la réduction de cette voie pourrait conduire à une réorientation de l'anabolisme lipidique vers un meilleur stockage des triglycérides, mais aucune preuve supplémentaire n'a été observée dans cette étude pour confirmer cette hypothèse.

Le groupe +1°C 24h/24h présente un profil particulier car nous mesurons une augmentation significative d'ELOVL6, ACLY et CEPT1 et une diminution significative de SOAT et d'ACSS1 avant gavage, comparés à tous les autres groupes au même âge. Comme nous n'avons pas observé de phénotype particulier à ce stade (ni sur le poids du foie ni sur le contenu lipidique), il est difficile de comprendre et d'expliquer ce fort impact sur l'expression des ARNm.

Concernant le métabolisme glucidique après gavage nous avons mesuré une augmentation de l'expression de GLUT1, GLUT2 et GLUT3 dans tous les groupes. Ces protéines appartiennent à la grande famille des transporteurs de glucose et transportent passivement le glucose et d'autres hexoses dans plusieurs tissus (Zhao and Keating, 2007). Ces résultats confirment que la quantité élevée de glucose délivrée pendant 11 jours doit être absorbée et gérée par le foie, comme indiqué précédemment (Tavernier et al., 2020). Cependant, SGLT1, en tant que co-transporteur actif de sodium et de glucose, semble ne pas être fortement impacté par le gavage dans le foie. Son affinité extrêmement

élevée (Zhao and Keating, 2007) est probablement suffisante pour assurer le transport à travers la membrane des hépatocytes au cours de cette période.

Malgré l'application de la manipulation thermique embryonnaire lors de la période d'expression maximale de ces gènes (Massimino and Houssier, 2019), aucun effet de la MT n'a été mesuré après gavage. Comme vu précédemment nos prélèvements ont été fait 10h après le dernier repas, une étude récente mesurant la cinétique des expressions géniques après le dernier repas de gavage avait précédemment montré que l'expression maximale des transporteurs de glucose se produisait environ 2h après le dernier repas (Tavernier et al., 2017b). Il n'est donc pas exclu que la MT embryonnaire puisse avoir un impact sur les expressions génétiques après le gavage, mais il serait nécessaire de réaliser de nouvelles expériences, avec des prélèvements effectués plus tôt après le dernier repas pour répondre à cette question.

Comme pour le transport du glucose, le gavage augmente la voie de dégradation des glucides pour la plupart des gènes que nous avons mesurés (HK1, HK2, ENO1), comme indiqué précédemment (Tavernier et al., 2017b). Seul GAPDH, impliqué dans différentes voies est régulé négativement par le gavage. Cependant, ces mesures n'ont révélé aucun effet puissant de la MT.

L'ensemble de ces résultats nous permet de mettre en lumière plusieurs choses. D'abord, la programmation thermique embryonnaire semble en effet moduler le métabolisme hépatique du canard mulard au cours du gavage et permettre d'améliorer la production de foie gras (DuckProg et RNADuck).

Ensuite, notre étude sur l'ontogenèse hépatique (Ontoduck) confirme que la fenêtre de manipulation thermique utilisée lors de notre étude DuckProg était plutôt bien ciblée (E13-E27), puisqu'elle correspond à une période de forte expression des gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides. Cependant, le pic d'expression de ces gènes étant situé autour de E20, il semblerait intéressant de tester une réduction du temps de MT, afin de limiter les effets indésirables de cette hausse de température notamment au niveau de la mortalité embryonnaire. De plus, il n'est pas exclu que la période précédant E12, lorsque le foie n'est pas encore identifiable, soit une période de forte expression de gènes d'intérêt et donc une période d'intérêt pour la programmation métabolique.

Néanmoins, il est encore possible que le stimulus thermique appliqué jusqu'à E27 ait eu un impact sur l'activité de ChREBP. En tant que facteur de transcription majeur jouant un rôle clé dans le métabolisme des glucides et des lipides (Wang et al., 2015; Ortega-Prieto and Postic, 2019), il n'est pas exclu que la hausse de la température au cours de son pic d'expression ait eu une contribution importante dans l'augmentation du poids de foie après gavage dans les groupes MT. Seules de nouvelles expériences de programmation avec différents protocoles de stimulation thermique et une analyse approfondie de l'impact sur l'expression et l'activité de ChREBP pourraient fournir une réponse définitive sur son rôle spécifique et celui d'autres gènes liés au métabolisme glucidique.

Par ailleurs, une nouvelle fenêtre de programmation pourrait être envisagée autour du 4ème jour post-éclosion, au moment des premiers repas. Nous avons en effet montré que cette période, assimilée à une transition alimentaire correspondait à une phase de plasticité d'expression des gènes du métabolisme, suggérant donc une susceptibilité à un stress environnemental, tel qu'une MT.

## **Conclusion et perspectives**

Dans ces travaux de thèse nous avons pu mettre en évidence un effet des manipulations thermiques embryonnaires sur la production de foie gras. Nous avons pu démontrer un développement accéléré, une baisse de la température de surface corporelle chez les cannetons et une augmentation de la stéatose hépatique après gavage. A notre connaissance, cette étude est la première à démontrer un impact positif de la manipulation thermique embryonnaire sur la production de foie gras des canards mulards gavés. Cette thèse ouvre non seulement un vaste domaine de recherche agronomique mais suscite également un intérêt fondamental pour l'étude des mécanismes sous-jacents impliqués dans la « programmation thermique ».

Néanmoins plusieurs limites ont été identifiées, premièrement le **taux d'humidité relative** relevé par les sondes était inférieur aux valeurs attendues, cette baisse d'humidité a pu entraîner une baisse d'éclosabilité suite à une déshydratation des œufs par exemple. L'impact observé des manipulations thermiques est peut-être le résultat d'une combinaison entre l'augmentation de température et l'augmentation d'humidité relative dans les incubateurs. À ce stade nous ne pouvons pas conclure sur ce point, il serait important de tester le groupe contrôle et les groupes traités avec le même taux d'humidité relative pour déterminer l'impact de l'humidité sur nos différents résultats.

Deuxièmement nous avons utilisé un thermomètre infrarouge donnant une indication sur la **température de surface** de l'animal de façon probablement moins précise que la prise de température interne par insertion d'un thermomètre dans le rectum des canards. Pour des raisons de faisabilité par rapport au nombre d'animaux présents et donc au nombre de mesures entreprises cela n'a pas été possible. De plus ce genre de mesures peut entraîner un stress chez l'animal en raison des contraintes physiques lors de la prise de température ce qui pourrait induire un biais lié au stress de l'animal. Une solution pourrait être l'utilisation de caméras thermiques permettant une prise de température de surface des animaux plus précise. Cet outil pourrait être utilisé à l'avenir pour les mesures de températures de surface.

Un troisième point qui pourrait être amélioré est le **moment d'abattage** qui était 10h après le dernier repas. Une réduction de ce délai pourrait être envisagé aux environs de 2-3h

après le dernier repas ce qui nous permettrait probablement d'observer des effets/variations plus fort(e)s aussi bien au niveau de l'expression des gènes que des paramètres plasmatiques.

L'étude Ontoduck nous a permis de cibler une période de programmation resserrée autour de E20 qui semble être le choix le plus pertinent compte tenu du pic d'expression des gènes du développement et liés aux glucides. Nous avons aussi pu observer une augmentation significative de l'expression des gènes liés aux lipides après les premiers repas, ce qui suggère que cette période pourrait également être une phase de programmation intéressante. Cette étude nous a fourni plusieurs éléments clés pour tenter d'améliorer la programmation thermique embryonnaire appliquée à la production de foie gras. Elle nous a permis d'envisager la mise en place d'une future expérimentation avec une légère réduction de la fenêtre de programmation utilisée pour la production de foie gras chez le canard mulard. La manipulation thermique embryonnaire peut présenter des formes infinies en variant la durée quotidienne, la période ou le niveau de température. Maintenant que le seuil maximum d'augmentation cumulative de température a été défini (+332°C) et que la meilleure période d'incubation est déterminée, nous pouvons concevoir de nouveaux protocoles d'incubation avec une précision accrue pour améliorer la technique. Lors de la dernière expérimentation nous avons observé que très peu de gènes ont été impactés par la manipulation thermique que ce soit avant ou après gavage. Les gènes impactés n'ont pas leurs pics entre E12 et E27 de ce fait nous pouvons réfléchir sur le choix de faire une manipulation thermique embryonnaire pendant le pic d'expression des gènes d'intérêts.

Une étude de l'expression des gènes pendant la manipulation thermique pourrait permettre d'obtenir des éléments d'explication concernant notre modèle (par rapport à la modification de l'expression de gènes glucidiques après gavage, l'augmentation du poids de foie ou la diminution de la température de surface corporelle). Ceci nous permettrait d'optimiser davantage les conditions d'incubation des œufs des futures expérimentations. Pour cela il faudra identifier les voies de signalisation impactées directement par ces modifications de température (réaction au stress thermique, métabolisme, thermogenèse, modification épigénétique), en comparant l'expression de différents gènes et protéines d'intérêt avant, pendant et à la fin du stimulus thermique. Il serait également intéressant d'étudier l'impact

de différentes MTs au niveau des hépatocytes en comparant leurs nombres avant, pendant et après la manipulation thermique au cours du développement embryonnaire.

Avec l'étude DuckProg, nous avons confirmé l'existence d'un lien potentiel entre la taille des gouttelettes lipidiques dans le foie et le taux de fonte à la cuisson, laissant supposer l'existence de mécanismes d'hyperplasie ou hyperphagie différemment modulés par la programmation thermique embryonnaire. La méthode histologique de mesure de la taille des gouttelettes lipidiques devra être améliorée, des échantillons avaient été prélevés et congelés dans le but de faire des immunomarquages ciblés ainsi qu'une coloration oil red (marquant les lipides) qui serait certainement plus adaptés à la mesure de la taille des gouttelettes lipidiques. Nous souhaitons approfondir ces observations pour établir l'existence ou non d'une corrélation entre la structure des gouttelettes lipidiques avant cuisson et la fonte des foies, et comprendre les mécanismes à l'origine de ces différences structurales et qualitatives. Des analyses d'expression génétique et protéique de facteurs d'intérêt nous permettront de conclure quant à l'impact de la programmation thermique sur ces critères primordiaux pour la filière.

Notre étude a été réalisée en période hivernale et malheureusement ne prend pas en compte la réponse des animaux à la chaleur. Il serait donc intéressant de regarder la réponse du métabolisme et de la capacité de thermorégulation des canards mulards lors d'une MT embryonnaire pendant le gavage en période estivale. Cette période pouvant être assimilée à un stress thermique, modifie chez le poulet l'expression de nombreux gènes qui sont potentiellement favorables à une adaptation du métabolisme cellulaire au nouvel environnement. Il serait donc intéressant d'analyser les conséquences sur le plan moléculaire, physiologique et sur la thermorégulation d'une MT suivi d'un gavage dans des conditions de challenge thermique.

Pour aller plus loin dans ces travaux, plusieurs études pourraient être mises en œuvre pour identifier les mécanismes impliqués. A petite échelle, tout d'abord, il pourrait être intéressant d'étudier certaines protéines (comme APOA1, ENO1, GPAT, DGAT2, FABP4, FAS) et leurs modifications post-traductionnelles après gavage. Des analyses d'activités enzymatiques, de séquençage haut débit (RNA-seq), d'analyse des modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ainsi que l'étude du métabolome du foie par spectrométrie de masse et chromatographie peuvent être envisagées sur le long terme. Il

serait intéressant d'étudier le protéome afin d'évaluer la quantité d'enzymes d'intérêt de nos différents groupes de canards mais aussi d'évaluer leur activité afin de confirmer les résultats de mesures d'expressions relatives présentées. Il est vrai que des modifications post transcriptionnelles ainsi que post traductionnelles peuvent intervenir dans l'activité effective des enzymes. Nous pouvons aussi envisager un challenge thermique post éclosion qui nous permettrait peut-être de déclencher une réaction avec une modification de l'expression de différents gènes d'intérêt.

Connaissant l'impact intergénérationnel des modifications épigénétiques il serait également intéressant de tester une MT sur les génotypes parentaux pour voir les effets sur la descendance chez le canard mulard chez qui il serait aussi possible d'appliquer une manipulation thermique pour peut-être amplifier les effets observés lors de la première expérimentation.

Les manipulations thermiques embryonnaires présentent de bonnes potentialités d'application pour améliorer la production de foie gras sur le plan économique et du bien-être animal. En effet, une réduction de la période de gavage pourrait être envisagée, et les manipulations thermiques embryonnaires pourraient permettre une meilleure adaptation des animaux en développement à la diversité de leur environnement futur.

## Références bibliographiques

- Abumrad, N., C. Harmon, and A. Ibrahim. 1998. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *Journal of Lipid Research* 39:2309–2318.
- Acheson, K., E. Jiquier, A. Burger, and E. Danforth. 1984. Thyroid Hormones and Thermogenesis: The Metabolic Cost of Food and Exercise. :4.
- Adzitey, F., and S. P. Adzitey. 2011. Duck Production: Has a Potential to Reduce Poverty among Rural Households in Asian Communities – A Review. :4.
- Ahmed, M. 2018. Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD).in *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Valenzuela, R., ed. IntechOpen, Rijeka.
- ALJohani, A. M., D. N. Syed, and J. M. Ntambi. 2017. Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28:831–842.
- Al-Rukibat, R. K., M. B. Al-Zghoul, W. M. Hananeh, M. Q. Al-Natour, and E. A. Abu-Basha. 2017. 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.

- Altan, O., A. Altan, I. Oguz, A. Pabuçcuoglu, and S. Konyalioglu. 2000. Effects of heat stress on growth, some blood variables and lipid oxidation in broilers exposed to high temperature at an early age. *British Poultry Science* 41:489–493.
- Al-Zghoul, M.-B., A. E. S. Dalab, I. E. Yahya, T. A. Althnaian, S. Y. Al-ramadan, A. M. Ali, I. F. Albokhadaim, S. M. El-Bahr, K. A. Al Busadah, and K. M. Hannon. 2015a. Thermal manipulation during broiler chicken embryogenesis: Effect on mRNA expressions of Hsp108, Hsp70, Hsp47 and Hsf-3 during subsequent post-hatch thermal challenge. *Research in Veterinary Science* 103:211–217.
- Al-Zghoul, M.-B., A. E. S. Dalab, I. E. Yahya, T. A. Althnaian, S. Y. Al-ramadan, A. M. Ali, I. F. Albokhadaim, S. M. El-Bahr, K. A. Al Busadah, and K. M. Hannon. 2015b. Thermal manipulation during broiler chicken embryogenesis: Effect on mRNA expressions of Hsp108, Hsp70, Hsp47 and Hsf-3 during subsequent post-hatch thermal challenge. *Research in Veterinary Science* 103:211–217.
- Al-Zghoul, M.-B., Z. B. Ismail, A. E. S. Dalab, A. Al-Ramadan, T. A. Althnaian, S. Y. Al-ramadan, A. M. Ali, I. F. Albokhadaim, K. A. Al Busadah, A. Eljarah, K. I. Jawasreh, and K. M. Hannon. 2015c. 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-Zhgoul, M.-B., A. E. S. Dalab, M. M. Ababneh, K. I. Jawasreh, K. A. A. Busadah, and Z. B. Ismail. 2013. Thermal manipulation during chicken embryogenesis results in enhanced Hsp70 gene expression and the acquisition of thermotolerance. *Research in Veterinary Science* 95:502–507.
- Amand, G., C. Aubert, C. Bourdette, I. Bouvarel, and D. Chevalier. 2004. La prévention du coup de chaleur en aviculture. *Sciences et Techniques Avicoles, Hors-série*, 64p.
- Ambrosio, R., V. Damiano, A. Sibilio, M. A. De Stefano, V. E. Avvedimento, D. Salvatore, and M. Dentice. 2013. Epigenetic control of type 2 and 3 deiodinases in myogenesis: role of Lysine-specific Demethylase enzyme and FoxO3. *Nucleic Acids Research* 41:3551–3562.
- André, J. M., G. Guy, K. Gontier-Latonnelle, M. D. Bernadet, B. Davail, R. Hoo-Paris, and S. Davail. 2007. Influence of lipoprotein-lipase activity on plasma triacylglycerol concentration and lipid storage in three genotypes of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 148:899–902.
- Annabelle, T., R. Karine, B. Marie-Dominique, G. Karine, and D. Stéphane. 2018. Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 438:111–121.
- Arad, Z., and J. Marder. 1983. Acid-base regulation during thermal panting in the fowl (*Gallus domesticus*): Comparison between breeds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 74:125–130.
- Archer, G. S., H. L. Shivaprasad, and J. A. Mench. 2009. Effect of providing light during incubation on the health, productivity, and behavior of broiler chickens. *Poultry Science* 88:29–37.
- ARJONA, A. A., D. M. DENBOW, and W. D. WEAVER JR. 1988. Effect of Heat Stress Early in Life on Mortality of Broilers Exposed to High Environmental Temperatures Just Prior to Marketing. *Poultry Science* 67:226–231.

- Au, W.-S., H. -f. Kung, and M. C. Lin. 2003. Regulation of Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene by Insulin in HepG2 Cells: Roles of MAPKerk and MAPKp38. *Diabetes* 52:1073–1080.
- Auvergne, A. 1992. Facteurs de variation de la composition corporelle et tissulaire des canards avant et après gavage. Thèse de Doctorat d'Etat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 252p.
- Babilé, R. 1989. La production de foies gras de canards de Barbarie (*Caïrina moschata*) : Aspects génétiques, nutritionnels et technologiques. Thèse de Doctorat, INP Toulouse, France, 231p.
- Babilé, R., and A. Auvergne. 1986. Qualité des foies gras : Comparaison de différentes méthodes d'appréciation de la fonte lipidique. Evolution en fonction du temps. *Rec. Med. Vet.*, 162, 151-156.
- Babilé, R., A. Auvergne, V. Andrade, F. Héraut, G. Bénard, M. Bouillier-oudot, and H Manse. 1996. Réversibilité de la stéatose hépatique chez le canard mulard. :2èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux, France. 107-110.
- Babilé, R., A. Auvergne, L. . Borgida, and G. Chambart. 1994. L'apport protéique et minéral au cours du gavage est bénéfique. *L'aviculteur*, 81-82.
- Babilé, R., A. Auvergne, J. P. Dubois, G. Bénard, and H. Manse. 1998. Réversibilité de la stéatose hépatique chez l'oie. :3ème Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie gras, Bordeaux, 27 au 27 octobre, 45-48.
- Babilé, R., A. Auvergne, I. Setiawan, E. Joly, and G. Latil. 1993. Conduite alimentaire au cours du gavage des canards et qualité technologique du foie gras. 1ères Journ. Rech. Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France, 107-116.
- Baéza, E., N. Rideau, P. Chartrin, S. Davail, R. Hoo-Paris, J. Mourot, G. Guy, M. D. Bernadet, H. Juin, K. Météau, and others. 2005. Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides: aptitude à l'engraissement. *INRA Prod. Anim* 18:131–141.
- Baldwin, A. R., and M. S. Sniogowski. 1951. Fatty acid compositions of lipids from corn and grain sorghum kernels. *J Am Oil Chem Soc* 28:24–27.
- Ballard, F. ., and I. . Oliver. 1963. Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 71:578–588.
- Banerjee, D., and C. M. Redman. 1983. Biosynthesis of high density lipoprotein by chicken liver: nature of nascent intracellular high density lipoprotein. *The Journal of cell biology* 96:651–660.
- Barker, D. J. P. 1998. In utero programming of chronic disease. :14.
- Barker, D. J., C. N. Hales, C. H. D. Fall, C. Osmond, K. Phipps, and P. M. S. Clark. 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36:62–67.
- Bartlett, K., and S. Eaton. 2004. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem* 271:462–469.

- Batellier, F., F. Marchal, M. F. Scheller, J. Gautron, N. Sellier, M. Taouis, C. Monbrun, A. Vignal, and J. P. Brillard. 2004. Sex ratios in mule duck embryos at various stages of incubation. *Theriogenology* 61:573–580.
- Baudonnet, C. 1993. Facteurs de variation de la composition biochimique et de la qualité technologique des foies gras de canards. Thèse de Doctorat d'Etat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 182p.
- Bénard, G., P. Bénard, D. Prehn, T. Bengone, J. Y. Jouglar, and S. Durand. 1998. Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. Etude réalisée sur 3 cycles de gavage-dégavage. :3èmes journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie gras, Bordeaux, 27 au 27 octobre, 49-52.
- BENARD, G., T. BENGONE, D. PREHN, S. DURAND, C. LABIE, and P. BENARD. 2006. Contribution à l'étude de la physiologie du canard en gavage: étude de la stéatose hépatique. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Bénard, G., and C. Labie. 1998. Evolution histologique du foie des palmipèdes au cours du gavage. 3èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie gras, Bordeaux, 27 au 27 octobre, 31-36.
- Bensadoun, A. 1991. Lipoprotein Lipase. :21.
- Bensadoun, A., and A. Rothfeld. 1972. The form of absorption of lipids in the chicken, *Gallus domesticus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*:141, 814–817.
- Bergen, W. G., and H. J. Mersmann. 2005. Comparative Aspects of Lipid Metabolism: Impact on Contemporary Research and Use of Animal Models. *The Journal of Nutrition* 135:2499–2502.
- Bernsmeier, C., and M. Heim. 2011. Stéatose hépatique non alcoolique et stéatohépatite non alcoolique. *Forum Med Suisse* 11 Available at <https://doi.emh.ch/fms.2011.07418> (verified 18 October 2019).
- Berri, C., N. Wacrenier, N. Millet, and E. Le Bihan-Duval. 2001. Effect of Selection for Improved Body Composition on Muscle and Meat Characteristics of Broilers from Experimental and Commercial Lines. *Poultry Science* 80:833–838.
- Besnard, P., I. Niot, H. Poirier, A. Bernard, and C. Caseeli. 1997. Aspects cellulaires et moléculaires de l'absorption intestinale des acides gras. *Oléagineux, Corps gras et Lipides*.
- Blum, J. C., C. Labie, and P. Raynaud. 1990. Influence du poids et de la composition chimique du foie gras d'oie sur la fonte mesurée après stérilisation à 104°C. *Sci. des Aliment.* 10, 543–554.
- Blum, J. C., G. Monachon, and B. Leclercq. 1971. Liver steatosis of force-fed geese as influenced by the protein level of the diet. *Acta Vet. Academiae Scientiarum Hungaricae*, 21, 307-311.
- Bodin, L., A. Sécula, H. Chapuis, A. Cornuez, M. Lessire, E. Cobo, S. Marie-Louise, C. M. D. Bonnefont, J. Barrieu, F. Mercierand, C. Bravo, H. Manse, M. C. Le Bourhis, X. Martin, F. Pitel, J. M. Brun, and M. Morisson. 2019. Dietary methionine deficiency reduces laying performances of female common ducks and impacts traits of interest of their mule ducklings. *Poultry Science* 98:5590–5600.

- Bouillier-oudot, M., J. P. Dubois, A. Auvergne, R. Babilé, and X. Fernandez. 2008. Incidence du rythme de gavage et du sexe sur les performances zootechniques d'oies et les caractéristiques chimiques, histologiques et technologiques des foies gras. 8èmes Journ. Rech. Palmipèdes à Foie Gras, Arcachon, France. 131-134.
- Bouillier-oudot, M., S. Leprettre, J. P. Dubois, and R. Babilé. 2002. Itinéraires post mortem et caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies. 5èmes Journ. Rech. Palmipèdes à Foie Gras, Pau, France, 172-175.
- Bouillier-oudot, M., S. Leprettre, J. P. Dubois, and R. Babilé. 2004. Evolution de la composition hépatique lors du refroidissement post mortem de foies gras d'oies dans la carcasse. 6èmes Journ. Rech. Palmipèdes à Foie Gras, Arcachon, France, 203-206.
- Bowen, S. J., and K. W. Washburn. 1985. Thyroid and Adrenal Response to Heat Stress in Chickens and Quail Differing in Heat Tolerance<sup>1</sup>. *Poultry Science* 64:149–154.
- Bowen, S. J., K. W. Washburn, and T. M. Huston. 1984. Involvement of the Thyroid Gland in the Response of Young Chickens to Heat Stress<sup>1</sup>. *Poultry Science* 63:66–69.
- Brent, G. A. 2008. Graves' Disease. *N Engl J Med* 358:2594–2605.
- Brigmon, R. ., E. . Besch, and F. . Mather. 1992. Seasonal temperature and its influence on plasma corticosterone, triiodothyronine, thyroxine, plasma protein and packed cell volume in mature male chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 102:289–293.
- Brillard, J. P. 1993. Sperm Storage and Transport Following Natural Mating and Artificial Insemination. *Poultry Science* 72:923–928.
- Brown, A.-M., and G. F. Gibbons. 2001. Insulin Inhibits the Maturation Phase of VLDL Assembly via a Phosphoinositide 3-Kinase—Mediated Event. *ATVB* 21:1656–1661.
- Brun, J.-M., and C. Larzul. 2003. Inheritance of reproductive traits of female common ducks ( *Anas platyrhynchos* ) in pure breeding and in inter-generic crossbreeding with muscovy ducks ( *Cairina moschata* ). *British poultry science* 44:40–5.
- Brun, J., M. M. Richard, C. Marie-Etancelin, R. Rouvier, and C. Larzul. 2005. Le canard mulard: déterminisme génétique d'un hybride intergénérique. *PRODUCTIONS ANIMALES-PARIS- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-* 18:295.
- Brun, J. M., N. Sellier, M. M. Richard, and F. Batellier. 2004. Effects of sperm storage duration and age of the common duck (*Anas platyrhynchos*) on fertility and embryonic survival in pure- or cross-breeding with muscovy drakes (*Cairina moschata*). *XXIIIndWorld Poult. Congr., Istanbul, Turquie, June 8-13, 2004, comm. 02.*
- Bureau, C., C. Hennequet-Antier, M. Couty, and D. Guémené. 2009. Gene array analysis of adrenal glands in broiler chickens following ACTH treatment. *BMC Genomics* 10:430.
- Butterwith, S. 1988. Avian adipose tissue: growth and metabolism. Pages 203–222 in *Leanness in Domestic Birds*. Elsevier.
- Buzala, M., B. Janicki, and R. Czarnecki. 2015. Consequences of different growth rates in broiler breeder and layer hens on embryogenesis, metabolism and metabolic rate: A review. *Poultry Science* 94:728–733.

- Byers, M. S., C. Howard, and X. Wang. 2017. Avian and Mammalian Facilitative Glucose Transporters. *Microarrays* 6:7.
- Calini, F., and F. Sirri. 2007. Breeder nutrition and offspring performance. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 9:77–83.
- Campbell, R., and C. Scanes. 1985. Adrenergic control of lipogenesis and lipolysis in the chicken in vitro. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology* 82:137–142.
- Carsia, R. V., H. Weber, and T. J. Lauterio. 1988. Protein Malnutrition in the Domestic Fowl Induces Alterations in Adrenocortical Function\*. *Endocrinology* 122:673–680.
- Carver, F. M., I. A. Shibley, Jr, J. S. Pennington, and S. N. Pennington. 2001. Differential expression of glucose transporters during chick embryogenesis: CMLS, *Cell. Mol. Life Sci.* 58:645–652.
- Castaing, J., and N. Robin. 1990. Alimentation énergétique du canard mulard. *Rev. Alim. Anim.*, 440, 22-25.
- Cazeils, J. L., M. Bouillier-Oudot, A. Auvergne, and R. Babilé. 1999. Influence de la composition biochimique de la membrane plasmique des hépatocytes sur le rendement après stérilisation des foies gras d'oies. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 150 (7) : 651-654.
- Chaffey, N. 2003. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell.* 4th edn. *Annals of Botany* 91:401–401.
- Charalambous, M., and A. Hernandez. 2013. Genomic imprinting of the type 3 thyroid hormone deiodinase gene: Regulation and developmental implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830:3946–3955.
- Chartrin, P., M.-D. Bernadet, G. Guy, J. Mourot, J.-F. Hocquette, N. Rideau, M. J. Duclos, and E. Baéza. 2006. Does overfeeding enhance genotype effects on energy metabolism and lipid deposition in breast muscle of ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145:413–418.
- Chaumette, B., O. Kebir, C. Mam-lam-fook, J. Bourgin, B. P. Godsil, R. Gaillard, T. Jay, and M.-O. Krebs. 2016. Stress et transition psychotique : revue de la littérature. *L'Encéphale* 42.
- Cheng, S.-Y., J. L. Leonard, and P. J. Davis. 2010. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocrine Reviews* 31:139–170.
- Cherian, G., T. B. Holsonbake, M. P. Goeger, and R. Bildfell. 2002. Dietary CLA alters yolk and tissue FA composition and hepatic histopathology of laying hens. *Lipids* 37:751–757.
- Chiamolera, M. I., and F. E. Wondisford. 2009. Minireview: Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94:1472–1472.
- Christensen, V. L., W. E. Donaldson, and K. E. Nestor. 1999. Length of the plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. *British Poultry Science* 40:297–303.
- Clarke, S. D. 1993. Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation. *J. Anim. Sci.* 71:1957–1965.

- Cobbina, E., and F. Akhlaghi. 2017. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev* 49:197–211.
- Cogburn, L. A., N. Trakooljul, C. Chen, H. Huang, C. H. Wu, W. Carré, X. Wang, and H. B. White. 2018. Transcriptional profiling of liver during the critical embryo-to-hatchling transition period in the chicken (*Gallus gallus*). *BMC Genomics* 19 Available at <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-5080-4> (verified 10 September 2019).
- Coleman, M. A., and R. A. McNabb. 1975. Photoacceleration of Embryonic Development in Depigmented Japanese Quail Eggs. *Poultry Science* 54:1849–1855.
- Collin, A., L. Bedrani, T. Loyau, S. Mignon-Grasteau, S. Metayer-Coustard, C. Praud, V. D. Basilio, F. R. Rodon, D. Bastianelli, S. Tesseraud, C. Berri, and S. Yahav. 2011. L'acclimatation embryonnaire : une technique innovante pour limiter les mortalités liées au stress thermique chez le poulet. :8.
- Collin, A., C. Berri, S. Tesseraud, F. R. Rodon, S. Skiba-Cassy, S. Crochet, M. J. Duclos, N. Rideau, K. Tona, J. Buyse, and others. 2007. Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. *Poultry Science* 86:795–800.
- Collin, A., M. Picard, and S. Yahav. 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.
- Cooper, J. B. 1972. Effect of Light During Incubation on Hatchability of Turkey Eggs<sup>1</sup>. *Poultry Science* 51:1105–1108.
- Cooper, D. A., S.-C. Lu, R. Viswanath, R. N. Freiman, and A. Bensadoun. 1992. The structure and complete nucleotide sequence of the avian lipoprotein lipase gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1129:166–171.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research* 16:10881–10890.
- Cucco, M., B. Guasco, G. Malacarne, and R. Ottonelli. 2007. Effects of  $\beta$ -carotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the Grey Partridge, *Perdix perdix*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147:1038–1046.
- Curcio, C., A. M. Lopes, M. O. Ribeiro, O. A. Francoso Jr., S. D. Carvalho, F. B. Lima, J. E. Bicudo, and A. C. Bianco. 1999. Development of Compensatory Thermogenesis in Response to Overfeeding in Hypothyroid Rats\*. *Endocrinology* 140:3438–3443.
- Danforth, E., E. S. Horton, and M. O'Connell. 1979. Dietary-induced Alterations in Thyroid Hormone Metabolism during Overnutrition. :12.
- Darras, V. M. 2019. The Role of Maternal Thyroid Hormones in Avian Embryonic Development. *Front. Endocrinol.* 10:66.

- Davail, S., N. Rideau, G. Guy, J.-M. André, D. Hermier, and R. Hoo-Paris. 2003. Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 134:707–715.
- Day, C. P., and O. F. W. James. 1998. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114:842–845.
- De Oliveira, J. E., Z. Uni, and P. R. Ferket. 2008. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. *World’s Poultry Science Journal* 64:488–499.
- Debut, M., C. Berri, C. Arnould, D. Guemené, V. Santé-Lhoutellier, N. Sellier, E. Baéza, N. Jehl, Y. Jégo, C. Beaumont, and E. Le Bihan-Duval. 2005. Behavioural and physiological responses of three chicken breeds to pre-slaughter shackling and acute heat stress. *British Poultry Science* 46:527–535.
- Decuypere, E., and V. Bruggeman. 2007. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. *Poultry Science* 86:1037–1042.
- Denbow, D. 2000. Chapter 14. Gastrointestinal Anatomy and Physiology. *Sturkie’s Avian Physiology*.
- Dentin, R., J. Girard, and C. Postic. 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* 87:81–86.
- Desai, M., J. Babu, and M. G. Ross. 2007a. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293:R2306–R2314.
- Desai, M., D. Gayle, G. Han, and M. G. Ross. 2007b. Programmed Hyperphagia Due to Reduced Anorexigenic Mechanisms in Intrauterine Growth-Restricted Offspring. *Reprod Sci* 14:329–337.
- Desvignes, T., C. Fauvel, and J. Bobe. 2011. The nme gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 384:439–449.
- Di, S., R. Malcher-Lopes, K. C. Halmos, and J. G. Tasker. 2003. Nongenomic Glucocorticoid Inhibition via Endocannabinoid Release in the Hypothalamus: A Fast Feedback Mechanism. *J. Neurosci.* 23:4850.
- Dickerson, G. 1969. Experimental approaches in utilizing breed resources. *Anim. Breed. Abstr.*, 37, 191-202.
- Ding, F., Z. Pan, J. Kou, L. Li, L. Xia, S. Hu, H. Liu, and J. Wang. 2012. De novo lipogenesis in the liver and adipose tissues of ducks during early growth stages after hatching. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 163:154–160.
- Dolnik, V. R., and T. I. Blyumental. 1967. Autumnal Premigratory and Migratory Periods in the Chaffinch (*Fringilla coelebs coelebs*) and Some Other Temperate-Zone Passerine Birds. *The Condor* 69:435–468.
- Druyan, S. 2010. The effects of genetic line (broilers vs. layers) on embryo development. *Poultry Science* 89:1457–1467.

- Duchamp, C., and H. Barre. 1993. Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 265:R1076–R1083.
- DuRant, S. E., W. A. Hopkins, A. W. Carter, C. M. Stachowiak, and G. R. Hepp. 2013a. Incubation Conditions Are More Important in Determining Early Thermoregulatory Ability than Posthatch Resource Conditions in a Precocial Bird. *Physiological and Biochemical Zoology* 86:410–420.
- DuRant, S. E., W. A. Hopkins, A. W. Carter, C. M. Stachowiak, and G. R. Hepp. 2013b. Incubation Conditions Are More Important in Determining Early Thermoregulatory Ability than Posthatch Resource Conditions in a Precocial Bird. *Physiological and Biochemical Zoology* 86:410–420.
- DuRant, S. E., W. A. Hopkins, D. M. Hawley, and G. R. Hepp. 2012. Incubation temperature affects multiple measures of immunocompetence in young wood ducks (*Aix sponsa*). *Biology letters* 8:108–111.
- DuRant, S. E., W. A. Hopkins, and G. R. Hepp. 2011. Embryonic Developmental Patterns and Energy Expenditure Are Affected by Incubation Temperature in Wood Ducks (*Aix sponsa*). *Physiological and Biochemical Zoology* 84:451–457.
- Eaton, S. 2002. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Progress in lipid research* 41:197–239.
- Enesco, M., and D. Puddy. 1964. Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rats of various ages. *Am. J. Anat.* 114:235–244.
- Evans, A. J. 1972. In vitro lipogenesis in the liver and adipose tissues of the female Aylesbury duck at different ages. *British Poultry Science* 13:595–602.
- Evans, H. E., and A. L. Romanoff. 1960. *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*. *Avian Diseases* 4:541.
- Evock-Clover, C. M., S. M. Poch, M. P. Richards, C. M. Ashwell, and J. P. McMurtry. 2002. Expression of an uncoupling protein gene homolog in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133:345–358.
- Faluhelyi, N., and V. Csernus. 2007. The effects of environmental illumination on the in vitro melatonin secretion from the embryonic and adult chicken pineal gland. *General and comparative endocrinology* 152:154–8.
- Farhat, A., and E. R. Chavez. 2000. Comparative performance, blood chemistry, and carcass composition of two lines of Pekin ducks reared mixed or separated by sex. *Poultry Science* 79:460–465.
- Faure, J.-M., D. Guémené, and G. Guy. 2001. Is there avoidance of the force feeding procedure in ducks and geese? *Anim. Res.* 50:157–164.
- Fernandez, X., M. Bouillier-Oudot, C. Molette, M. D. Bernadet, and H. Manse. 2011. Duration of transport and holding in lairage at constant postprandial delay to slaughter--Effects on fatty liver and breast muscle quality in mule ducks. *Poultry Science* 90:2360–2369.

- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509.
- Fournier, E., R. Peresson, G. Guy, and D. Hermier. 1997. Relationships between storage and secretion of hepatic lipids in two breeds of geese with different susceptibility to liver steatosis. *Poultry Science* 76:599–607.
- Foury, A., N. A. Geverink, M. Gil, M. Gispert, M. Hortós, M. Font i Furnols, D. Carrion, S. Blott, G. Plastow, and P. Mormède. 2007. Stress neuroendocrine profiles in five pig breeding lines and the relationship with carcass composition. *Animal : an international journal of animal bioscience* 1:973–82.
- Freeman, B. M. 1969. The mobilization of hepatic glycogen in *Gallus domesticus* at the end of incubation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 28:1169–1176.
- Freeman, B. M., and M. A. Vince. 1974. Nutrition and Utilization of Albumen and Yolk. Pages 160–185 in *Development of the Avian Embryo: A Behavioural and Physiological Study*. Freeman, B.M., Vince, M.A., eds. Springer Netherlands, Dordrecht.
- French, N. A. 1994. Effect of incubation temperature on the gross pathology of turkey embryos. *British Poultry Science* 35:363–371.
- Fukuda-Taira, S. 1981. Hepatic induction in the avian embryo: Specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. :16.
- Gabarrou, J. F., M. R. Salichon, G. Guy, and J. C. Blum. 1996. Hybrid ducks overfed with boiled corn develop an acute hepatic steatosis with decreased choline and polyunsaturated fatty acid level in phospholipids. *Reprod. Nutr. Dev.* 36:473–484.
- Garriga, C., M. Moreto, and J. M. Planas. 1997. Hexose transport across the basolateral membrane of the chicken jejunum. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 272:R1330–R1335.
- Garriga, C., M. Moretó, and J. Planas. 1999. Hexose transport in the apical and basolateral membranes of enterocytes in chickens adapted to high and low NaCl intakes. *The Journal of physiology* 514 ( Pt 1):189–199.
- Geraert, P. A., J. C. F. Padilha, and S. Guillaumin. 1996. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens : biological and endocrinological variables. *Br J Nutr* 75:205–216.
- Geverink, N. A., A. Foury, G. Plastow, M. Gil, M. Gispert, M. Hortós, M. Font i Furnols, G. Gort, M.-P. Moisan, and P. Mormède. 2006. Cortisol-binding globulin and meat quality in five European lines of pigs. *Journal of animal science* 84:204–11.
- Gibbons, G. F. 1990. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. 268:13.
- Gibney, E. R., and C. M. Nolan. 2010. Epigenetics and gene expression. *Heredity* 105:4–13.
- Girard, J. 2009. De la physiologie métabolique à la biologie moléculaire : quatre décennies de cercles vertueux. *Médecine des Maladies Métaboliques* 3:123–128.

- Goglia, F., M. Moreno, and A. Lanni. 1999. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Letters* 452:115–120.
- Gontier, K., J.-M. André, M.-D. Bernadet, K. Ricaud, and S. Davail. 2013. Insulin effect on lipogenesis and fat distribution in three genotypes of ducks during overfeeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 164:499–505.
- Gonzalez, J., H. Düttmann, and M. Wink. 2009. Phylogenetic relationships based on two mitochondrial genes and hybridization patterns in Anatidae. *Journal of Zoology* 279:310–318.
- Goodridge, A. 1968. Metabolism of glucose-U-14C in vitro in adipose tissue from embryonic and growing chicks. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 214:897–901.
- Greco, D., A. Kotronen, J. Westerbacka, O. Puig, P. Arkkila, T. Kiviluoto, S. Laitinen, M. Kolak, R. M. Fisher, A. Hamsten, P. Auvinen, and H. Yki-Järvinen. 2008. Gene expression in human NAFLD. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294:G1281–G1287.
- Griffin, H., G. Grant, and M. Perry. 1982. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase *in vitro*. *Biochem. J.* 206:647–654.
- Griffin, H. D., K. Guo, D. Windsor, and S. C. Butterwith. 1992. Adipose Tissue Lipogenesis and Fat Deposition in Leaner Broiler Chickens. *The Journal of Nutrition* 122:363–368.
- Guémené, D., G. Guy, J. Noirault, N. Destombes, and J.-M. Faure. 2006. Rearing conditions during the force-feeding period in male mule ducks and their impact upon stress and welfare. *Animal Research* 55:443–458.
- Guémené, D., G. Guy, J. Noirault, M. Garreau-Mills, P. Gouraud, and J. M. Faure. 2001. Force-feeding procedure and physiological indicators of stress in male mule ducks. *British Poultry Science* 42:650–657.
- Guillam, M. T., P. Dupraz, and B. Thorens. 2000. Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 49:1485.
- Guo, J., G. Shu, L. Zhou, X. Zhu, W. Liao, S. Wang, J. Yang, G. Zhou, Q. Xi, P. Gao, Y. Zhang, S. Zhang, L. Yuan, and Q. Jiang. 2013. Selective transport of long-chain fatty acids by FAT/CD36 in skeletal muscle of broilers. *animal* 7:422–429.
- Haas, M. E., A. D. Attie, and S. B. Biddinger. 2013. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 24:391–397.
- Haldane, J. B. S. 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* 12:101–109.
- Hales, C. N., D. J. Barker, P. M. Clark, L. J. Cox, C. Fall, C. Osmond, and P. D. Winter. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Bmj* 303:1019–1022.
- Halevy, O., A. Krispin, Y. Leshem, J. P. McMurtry, and S. Yahav. 2001. Early-age heat exposure affects skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation in chicks. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281:R302-309.

- Hanson, R. W., and F. J. Ballard. 1967. The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. *Biochem J* 105:529–536.
- Harvey, S., B. J. Merry, and J. G. Phillips. 1980. INFLUENCE OF STRESS ON THE SECRETION OF CORTICOSTERONE IN THE DUCK (*ANAS PLATYRHYNCHOS*). :11.
- Haugaard, C. T., M. K. Bauer, and C. T. Haugaard. Rodent models of intrauterine growth restriction. . Vol. 28:13.
- Havenstein, G. B., P. R. Ferket, and M. A. Qureshi. 2003a. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* 82:1509–1518.
- Havenstein, G., P. Ferket, and M. Qureshi. 2003b. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* 82:1500–1508.
- Hazelwood, R. L., and F. W. Lorenz. 1959. Effects of fasting and insulin on carbohydrate metabolism of the domestic fowl. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 197:47–51.
- He, J., Y. Tian, J. Li, J. Shen, Z. Tao, Y. Fu, D. Niu, and L. Lu. 2013. Expression pattern of L-FABP gene in different tissues and its regulation of fat metabolism-related genes in duck. *Molecular Biology Reports* 40:189–195.
- Hepp, G. R., and R. A. Kennamer. 2012. Warm Is Better: Incubation Temperature Influences Apparent Survival and Recruitment of Wood Ducks (*Aix sponsa*) (A Roulin, Ed.). *PLoS ONE* 7:e47777.
- Hérault, F., G. Saez, E. Robert, A. Al Mohammad, S. Davail, P. Chartrin, E. Bañza, and C. Diot. 2009. Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Animal Genetics* 41:12–20.
- Hermier, D. 1988. Density distribution and physicochemical properties of plasma lipoproteins and apolipoproteins in the goose, *Anser anser*; a potential model of liver steatosis. :15.
- Hermier, D. 1997. Lipoprotein Metabolism and Fattening in Poultry. *The Journal of Nutrition* 127:805S-808S.
- Hermier, D., G. Guy, S. Guillaumin, S. Davail, J.-M. André, and R. Hoo-Paris. 2003. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135:663–675.
- Hermier, D., J. Mouro, G. Guy, and P. Peiniau. 1998. Lipogenèse hépatique et aptitude à la production de foie gras chez l'oie. 3èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux, France. 37-40.
- Hermier, D., D. Rousselot-Pailley, R. Peresson, and N. Sellier. 1994. Influence of orotic acid and estrogen on hepatic lipid storage and secretion in the goose susceptible to liver steatosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1211:97–106.
- Hermier, D., A. Saadoun, M.-R. Salichon, N. Sellier, D. Rousselot-Paillet, and M. J. Chapman. 1991. Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: Changes induced by development and force-feeding. *Lipids* 26:331–339.

- Hermier, D., M. Salichon, G. Guy, and R. Peresson. 1999. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in the goose. *Poultry Science* 78:1398–1406.
- Hocquette, J.-F., and D. Bauchart. 1999. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:27–48.
- Holemans, K., L. Aerts, and F. A. Van Assche. 2003. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *The Journal of Physiology* 547:11–20.
- Horowitz, M. 2014. Heat Acclimation, Epigenetics, and Cytoprotection Memory. Pages 199–230 in *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society.
- Houten, S. M., and R. J. A. Wanders. 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. *J Inher Metab Dis* 33:469–477.
- Howie, G. J., D. M. Sloboda, and M. H. Vickers. 2012. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br J Nutr* 108:298–307.
- Humphrey, B. D., C. B. Stephensen, C. C. Calvert, and K. C. Klasing. 2004. Glucose and cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 138:515–525.
- Hussain, M. M., P. Rava, M. Walsh, M. Rana, and J. Iqbal. 2012. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)* 9:14.
- Huth, J. C., and G. S. Archer. 2015. Effects of LED lighting during incubation on layer and broiler hatchability, chick quality, stress susceptibility and post-hatch growth. *Poultry Science* 94:3052–3058.
- Ipek, A., and A. Sozcu. 2017. Comparison of hatching egg characteristics, embryo development, yolk absorption, hatch window, and hatchability of Pekin Duck eggs of different weights. *Poultry Science* 96:3593–3599.
- Ishii, S., K. Iizuka, B. C. Miller, and K. Uyeda. 2004. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15597.
- Jackson, T. K., A. I. Salhanick, J. Elovson, M. L. Deichman, and J. M. Amatruda. 1990. Insulin regulates apolipoprotein B turnover and phosphorylation in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 86:1746–1751.
- Jackson-Hayes, L., S. Song, E. N. Lavrentyev, M. S. Jansen, F. B. Hillgartner, L. Tian, P. A. Wood, G. A. Cook, and E. A. Park. 2003. A Thyroid Hormone Response Unit Formed between the Promoter and First Intron of the Carnitine Palmitoyltransferase-1 $\alpha$  Gene Mediates the Liver-specific Induction by Thyroid Hormone. *J. Biol. Chem.* 278:7964–7972.
- Janke, O., B. Tzschentke, and M. Boerjan. 2004. Comparative Investigations of Heat Production and Body Temperature in Embryos of Modern Chicken Breeds. *Avian and Poultry Biology Reviews* 15:191–196.
- Jianhua, H., A. Ohtsuka, and K. Hayashi. 2000. Selenium influences growth via thyroid hormone status in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 84:727–732.

- Jimenez-Chillaron, J. C., M. Hernandez-Valencia, A. Lightner, R. R. Faucette, C. Reamer, R. Przybyla, S. Ruest, K. Barry, J. P. Otis, and M. E. Patti. 2006. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia* 49:1974–1984.
- Jung, J., M. Zheng, M. Goldfarb, and K. S. Zaret. 1999. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284:1998–2003.
- Kabashima, T., T. Kawaguchi, B. E. Wadzinski, and K. Uyeda. 2003. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5107.
- Kaewmanee, T., S. Benjakul, and W. Visessanguan. 2009. Changes in chemical composition, physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting. *Food Chemistry* 112:560–569.
- Kahn, B. B. 1998. Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to Compensate for Insulin Resistance. *Cell* 92:593–596.
- Karst, H., S. Berger, M. Turiault, F. Tronche, G. Schütz, and M. Joëls. 2005. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19204–19207.
- Katzeff, H. L. 1990. Increasing Age Impairs the Thyroid Hormone Response to Overfeeding. *Experimental Biology and Medicine* 194:198–203.
- Kelly, W. R., and B. Tindall. BOOK REVIEW EDITOR : J. M. RUTTER. :2.
- Keryer, G., and E. Bailly. 1994. Spécificité de l'action des protéine kinases et phosphatases dans la cellule. *Med Sci (Paris)* 10:408.
- de Kloet, E., M. Joels, and F. Holsboer. 2005. De Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463-475. *Nature reviews. Neuroscience* 6:463–75.
- Knížetová, H., J. Hyánek, L. Hyánková, and P. Bělíček. 1995. Comparative study of growth curves in poultry. *Genet Sel Evol* 27:365–375.
- Kono, T., M. Nishida, Y. Nishiki, Y. Seki, K. Sato, and Y. Akiba. 2005. Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *British Poultry Science* 46:510–515.
- Koonen, D. P. Y., R. L. Jacobs, M. Febbraio, M. E. Young, C.-L. M. Soltys, H. Ong, D. E. Vance, and J. R. B. Dyck. 2007. Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 56:2863.
- Koressaar, T., and M. Remm. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289–1291.
- Krebs, E. G., and J. A. Beavo. 1979. Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 48:923–959.
- Kwon, E. J., and Y. J. Kim. 2017. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *60:14.*

- Labie, C., G. Bénard, and B. Gauciere. 1989. Evolution de la stéatose hépatique chez le canard mulard au cours du gavage. *Rev. Med. Vet.*, 140, 809.
- Lake, P. . 1975. Gamete production and the fertile period with particular reference to domesticated birds. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 35, 225- 244.
- Larbier, M., and B. Leclercq. 1992. *Nutrition et alimentation des volailles. Du Labo au Terrain.* Paris, FRA : INRA Editions, 355 p.
- Larzul, C., B. Imbert, M.-D. Bernadet, G. Guy, and H. Réminon. 2006. Meat quality in an intergeneric factorial crossbreeding between muscovy ( *Cairina moschata* ) and Pekin ( *Anas platyrhynchos* ) ducks. *Animal Research* 55:219–229.
- Latil, G., A. Auvergne, and R. Babilé. 1996. Consommation du canard mulard en gavage. Relations avec les performances zootechniques et la qualité technologique du foie gras. 2èmes Journ. Rech. Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France, 93-97.
- Lenzen, S. 2014. A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status. *J. Biol. Chem.* 289:12189–12194.
- Leveille, G. A., D. R. Romsos, Y. Yeh, and E. K. O’Hea. 1975a. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult. Sci.* 54:1075–1093.
- Leveille, G. A., D. R. Romsos, Y.-Y. Yeh, and E. K. O’Hea. 1975b. Lipid Biosynthesis in the Chick. A Consideration of Site of Synthesis, Influence of Diet and Possible Regulatory Mechanisms. *Poultry Science* 54:1075–1093.
- Lewis, G. F., K. D. Uffelman, L. W. Szeto, and G. Steiner. 1993. Effects of Acute Hyperinsulinemia on VLDL Triglyceride and VLDL ApoB Production in Normal Weight and Obese Individuals. *42:10.*
- Li, H., Z. Li, and X. Liu. 2017a. An Overall View of the Regulation of Hepatic Lipid Metabolism in Chicken Revealed by New-Generation Sequencing. *Manafi, M., ed. InTech.*
- Li, X., J. Qiu, H. Liu, Y. Wang, J. Hu, X. Gan, and J. Wang. 2017b. Long-term thermal manipulation in the late incubation period can inhibit breast muscle development by activating endoplasmic reticulum stress in duck ( *Anas platyrhynchos domestica* ). *Journal of Thermal Biology* 70:37–45.
- Lin, H., E. Decuyper, and J. Buyse. 2006a. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 144:11–17.
- Lin, H., H. C. Jiao, J. Buyse, and E. Decuyper. 2006b. Strategies for preventing heat stress in poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* 62:71–86.
- Liu, H. C., J. F. Huang, S. R. Lee, H. L. Liu, C. H. Hsieh, C. W. Huang, M. C. Huang, C. Tai, J. P. Poivey, R. Rouvier, and Y. S. Cheng. 2015a. Selection for Duration of Fertility and Mule Duck White Plumage Colour in a Synthetic Strain of Ducks ( *Anas platyrhynchos* ). *Asian Australas. J. Anim. Sci* 28:605–611.

- Liu, R.-Z., X. Li, and R. Godbout. 2008. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis. *Genomics* 92:436–445.
- Liu, H., J. Liu, X. Yan, Q. Li, Y. Zhao, Y. Wang, R. Zhang, G. Wang, H. Wang, X. Li, C. Yang, L. Li, C. Han, and J. Wang. 2015b. Impact of thermal stress during incubation on gene expression in embryonic muscle of Peking ducks (*Anas platyrhynchos domestica*). *Journal of Thermal Biology* 53:80–89.
- Liu, K., H. Xin, J. Sekhon, and T. Wang. 2017. Effect of Fluorescent vs. Poultry-Specific Light-Emitting Diode Lights on Production Performance and Egg Quality of W-36 Laying Hens. :12.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402–408.
- Locsmáncsi, L., R. Romvári, F. Bogenfürst, A. Szabó, M. Molnár, G. Andrásy-Baka, and P. Horn. 2005. In vivo studies on goose liver development by means of computer tomography. *Animal Research* 54:135–145.
- Lopez, D., J. F. Abisambra Socarrás, M. Bedi, and G. C. Ness. 2007. Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771:1216–1225.
- Loyau, T., L. Bedrani, C. Berri, S. Métayer-Coustard, C. Praud, V. Coustham, S. Mignon-Grasteau, M. J. Duclos, S. Tesseraud, N. Rideau, C. Hennequet-Antier, N. Everaert, S. Yahav, and A. Collin. 2015. Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: a review. *Animal* 9:76–85.
- Loyau, T., C. Berri, L. Bedrani, S. Métayer-Coustard, C. Praud, M. J. Duclos, S. Tesseraud, N. Rideau, N. Everaert, S. Yahav, and others. 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. *Journal of animal science* 91:3674–3685.
- Loyau, T., C. Hennequet-Antier, V. Coustham, C. Berri, M. Leduc, S. Crochet, M. Sannier, M. J. Duclos, S. Mignon-Grasteau, S. Tesseraud, A. Brionne, S. Métayer-Coustard, M. Moroldo, J. Lecardonnel, P. Martin, S. Lagarrigue, S. Yahav, and A. Collin. 2016. Thermal manipulation of the chicken embryo triggers differential gene expression in response to a later heat challenge. *BMC Genomics* 17 Available at <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2661-y> (verified 14 November 2016).
- Lozano, C., V. De Basilio, I. Oliveros, R. Alvarez, I. Colina, D. Bastianelli, S. Yahav, and M. Picard. 2006. Is sequential feeding a suitable technique to compensate for the negative effects of a tropical climate in finishing broilers? *Anim. Res.* 55:71–76.
- Lukaszewski, M.-A., S. Mayeur, I. Fajardy, F. Delahaye, I. Dutriez-Casteloot, V. Montel, A. Dickes-Coopman, C. Laborie, J. Lesage, D. Vieau, and C. Breton. 2011. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 301:E548–E559.

- Lumeij, J. T., and I. Westerhof. 1988. Clinical evaluation of thyroid function in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathology* 17:63–70.
- Lumey, L., A. D. Stein, H. S. Kahn, K. M. van der Pal-de Bruin, G. Blauw, P. A. Zybert, and E. S. Susser. 2007. Cohort Profile: The Dutch Hunger Winter Families Study. *International Journal of Epidemiology* 36:1196–1204.
- Maatjens, C. M., I. A. M. van Roovert-Reijrink, B. Engel, C. W. van der Pol, B. Kemp, and H. van den Brand. 2016. Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic organ development. *Poult. Sci.* 95:956–965.
- Madison, B. B. 2016. Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. *J Lipid Res* 57:333–335.
- Malmstrom, R., C. J. Packard, M. Caslake, D. Bedford, P. Stewart, H. Yki-Jarvinen, J. Shepherd, and M. R. Taskinen. 1998. Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes* 47:779–787.
- Maltby, V., A. Somaiya, N. A. French, and N. C. Stickland. 2004. *In ovo* temperature manipulation influences post-hatch muscle growth in the turkey. *British Poultry Science* 45:491–498.
- Marandel, L., C. Labbe, J. Bobe, and P.-Y. Le Bail. 2012. Evolutionary history of c-myc in teleosts and characterization of the duplicated c-myca genes in goldfish embryos. *Molecular Reproduction and Development* 79:85–96.
- Marchesini, G., M. Brizi, A. M. Morselli-Labate, G. Bianchi, E. Bugianesi, A. J. McCullough, G. Forlani, and N. Melchionda. 1999. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *The American Journal of Medicine* 107:450–455.
- Marie-Etancelin, C., B. Basso, S. Davail, K. Gontier, X. Fernandez, Z. G. Vitezica, D. Bastianelli, and E. Baeza. 2011. Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks. :11.
- Marie-Etancelin, C., H. Chapuis, J. M. Brun, C. Larzul, M. M. Mialon-Richard, and R. Rouvier. 2008. Genetics and selection of mule ducks in France: a review. *World's Poultry Science Journal* 64:187–208.
- Marques-Lopes, I., L. Forga, and J. A. Martinez. 2003. Thermogenesis Induced by a High-Carbohydrate Meal in Fasted Lean and Overweight Young Men: Insulin, Body Fat, and Sympathetic Nervous System Involvement. 19:5.
- Massimino, W., and M. Houssier. 2019. Positive Impact of Thermal Manipulation During Embryogenesis on Foie Gras Production in Mule Ducks. *Frontiers in Physiology* 10:13.
- Mayes, P. A. 1996. Biosynthèse des acides gras. In : Précis de biochimie de Happer. Murray, K. M., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (Eds), De Boeck Université, 241-249.
- McFarlan, J. T., A. Bonen, and C. G. Guglielmo. 2009. Seasonal upregulation of fatty acid transporters in flight muscles of migratory white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *J. Exp. Biol.* 212:2934.
- McGarry, J. D., and N. F. Brown. 1997. The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System - From Concept to Molecular Analysis. *Eur J Biochem* 244:1–14.

- Molenaar, R., J. J. G. C. van den Borne, E. Hazejager, N. B. Kristensen, M. J. W. Heetkamp, R. Meijerhof, B. Kemp, and H. van den Brand. 2013. High Environmental Temperature Increases Glucose Requirement in the Developing Chicken Embryo (A Alisi, Ed.). *PLoS ONE* 8:e59637.
- Molenaar, R., I. Reijrink, R. Meijerhof, and H. Van den Brand. 2010. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: a review. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 12:137–148.
- Moraes, V. M. B., R. D. Malheiros, V. Bruggeman, A. Collin, K. Tona, P. Van As, O. M. Onagbesan, J. Buyse, E. Decuyper, and M. Macari. 2003. Effect of thermal conditioning during embryonic development on aspects of physiological responses of broilers to heat stress. *Journal of Thermal Biology* 28:133–140.
- Moran, E. T. 1985. Digestion and Absorption of Carbohydrates in Fowl and Events through Perinatal Development. *The Journal of Nutrition* 115:665–674.
- Moran, E. T. 2007. Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. *Poultry Science* 86:1043–1049.
- Morand-Fehr, P., and G. Tran. 2001. La fraction lipidique des aliments et les corps gras utilisés en alimentation animale. *Productions Animales* 5 (14), 285-302.(2001).
- Mormède, P., H. Courvoisier, A. Ramos, N. Arvy, O. Ousova, C. Désautés, M. Duclos, F. Chaouloff, and M.-P. Moisan. 2002. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology* 27:563–83.
- Mourot, J., and M. Kouba. 1999. Development of intra- and intermuscular adipose tissue in growing Large White and Meishan pigs. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:125–132.
- Mueckler, M., C. Caruso, S. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H. Morris, W. Allard, G. Lienhard, and H. Lodish. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941.
- Mujahid, A., Y. Yoshiki, Y. Akiba, and M. Toyomizu. 2005. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poultry Science* 84:307–314.
- Murdoch, B. M., G. K. Murdoch, S. Greenwood, and S. McKay. 2016. Nutritional Influence on Epigenetic Marks and Effect on Livestock Production. *Front. Genet.* 7 Available at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2016.00182/full> (verified 13 September 2019).
- Nakamuta, M., T. Fujino, R. Yada, M. Yada, K. Yasutake, T. Yoshimoto, N. Harada, N. Higuchi, M. Kato, M. Kohjima, A. Taketomi, Y. Maehara, M. Nakashima, K. Kotoh, and M. Enjoji. 2009. Impact of cholesterol metabolism and the LXR- $\alpha$ -SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*:6.
- Nangsuay, A., R. Meijerhof, I. van den Anker, M. J. W. Heetkamp, B. Kemp, and H. van den Brand. 2015. Development and nutrient metabolism of embryos from two modern broiler strains. *Poultry Science* 94:2546–2554.
- Narınç, D., S. Erdoğan, E. Tahtacıen, and T. Aksoy. 2016. Effects of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chickens on developmental stability, hatchability and chick quality. *animal* 10:1328–1335.
- Nassar, M., I. Halle, A. Plagemann, and B. Tzschentke. 2015. Detection of long-term influence of prenatal temperature stimulation on hypothalamic type-II iodothyronine deiodinase in

- juvenile female broiler chickens using a novel immunohistochemical amplification protocol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 179:120–124.
- Nelson, P., G. Yarnell, and S. R. Wagle. 1966. Biochemical studies of the developing embryo: II. Studies on CO<sub>2</sub> fixation enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 114:543–546.
- Nichelmann, M., J. Höchel, and B. Tzschentke. 1999. Biological rhythms in birds—development, insights and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 124:429–437.
- Nir, I., and Z. Nitsan. 1976. Goose fatty liver composition as related to degree of steatosis, nutritional and technological treatments, and simplified method for quality estimation. *Ann. Zoot.*, 25, 461-470.
- Nir, I., Z. Nitsan, and A. Vax. 1973. THE INFLUENCE OF FORCE FEEDING AND OF PROTEIN SUPPLEMENTATION TO THE DIET ON THE METABOLISABLE ENERGY OF DIETS, DIGESTIBILITY OF NUTRIENTS, NITROGEN RETENTION AND DIGESTIVE ENZYMES OUTPUT IN GEESE. :16.
- Nitsan, Z., I. Nir, Y. Dror, and I. Bruckental. 1973. The Effect of Forced Feeding and of Dietary Protein Level on Enzymes Associated with Digestion, Protein and Carbohydrate Metabolism in Geese. *Poultry Science* 52:474–481.
- Noble, R. C., and M. Cocchi. 1990. Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Progress in lipid research* 29:107–140.
- Noble, R. C., and D. Ogunyemi. 1989. Lipid changes in the residual yolk and liver of the chick immediately after hatching. *Biol. Neonate* 56:228–236.
- Noiva, R. M., A. C. Menezes, and M. C. Peleteiro. 2014. Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. *BMC Vet Res* 10:234.
- Noy, Y., and D. Sklan. 1999. Energy utilization in newly hatched chicks. *Poult. Sci.* 78:1750–1756.
- Ntambi, J. 2004. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research* 43:91–104.
- Obregon, M.-J. 2008. Thyroid Hormone and Adipocyte Differentiation. *Thyroid* 18:185–195.
- OCDE. 2019. PERSPECTIVES AGRICOLES DE L'OCDE ET DE LA FAO 2019-2028. OECD, S.I.
- Odum, E. P. 1960. Premigratory Hyperphagia in Birds. *Am J Clin Nutr* 8, 621–629.
- Olofsson, S.-O., and J. Boren. 2005. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 258:395–410.
- Olver, M. D., J. J. Preez, M. A. Kuyper, and D. J. Mould. 1977. The carcass composition and growth of the “mule” ducklings compared to purebred ducklings. *Agroanimalia*, 9, 7-12.

- Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, J. T. Lane, and M. P. Thompson. 1991. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* 87:125–132.
- Ortega-Prieto, P., and C. Postic. 2019. Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet* 10:472–472.
- Park, L. K., S. Friso, and S.-W. Choi. 2012. Nutritional influences on epigenetics and age-related disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 71:75–83.
- Park, J. H., D. A. Stoffers, R. D. Nicholls, and R. A. Simmons. 2008. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest.*:JCI33655.
- Pearce, J. 1980. Comparative aspects of lipid metabolism in avian species. *Biochim. Soc. Trans.* 8:295–296.
- Petersen, M. C., D. F. Vatner, and G. I. Shulman. 2017. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 13:572–587.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet, and T. P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26:509–515.
- Piestun, Y., S. Druyan, J. Brake, and S. Yahav. 2013. Thermal manipulations during broiler incubation alter performance of broilers to 70 days of age. *Poultry Science* 92:1155–1163.
- Piestun, Y., O. Halevy, D. Shinder, M. Ruzal, S. Druyan, and S. Yahav. 2011. Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. *Journal of Thermal Biology* 36:469–474.
- Piestun, Y., M. Harel, M. Barak, S. Yahav, and O. Halevy. 2008a. Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects on myoblast proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology* 106:233–240.
- Piestun, Y., M. Harel, M. Barak, S. Yahav, and O. Halevy. 2009. Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects on myoblast proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology* 106:233–240.
- Piestun, Y., D. Shinder, M. Ruzal, O. Halevy, J. Brake, and S. Yahav. 2008b. Thermal Manipulations During Broiler Embryogenesis: Effect on the Acquisition of Thermotolerance. *Poultry Science* 87:1516–1525.
- Piestun, Y., D. Shinder, M. Ruzal, O. Halevy, J. Brake, and S. Yahav. 2008c. Thermal Manipulations During Broiler Embryogenesis: Effect on the Acquisition of Thermotolerance. *Poultry Science* 87:1516–1525.
- Piestun, Y., S. Yahav, and O. Halevy. 2015. Thermal manipulation during embryogenesis affects myoblast proliferation and skeletal muscle growth in meat-type chickens. *Poultry Science* 94:2528–2536.
- Pittman, C. S., J. B. Chambers, and V. H. Read. 1971. The extrathyroidal conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in normal man. *J. Clin. Invest.* 50:1187–1196.

- Pörtner, H. O., and A. P. Farrell. 2008. Physiology and Climate Change. *Science* 322:690.
- Poujardieu, B., F. Guichard, and P. Laventure. 1994. Paramètres génétiques de croissance et de gavage de la cane commune. *Genet Sel Evol* 26:463–472.
- Prager, E., and P. Jollès. 1996. Animal lysozymes c and g: an overview. *EXS* 75:9—31.
- Printz, R. L., M. A. Magnuson, and D. K. Granner. 1993. Mammalian Glucokinase. *Annual Review of Nutrition* 13:463–496.
- Puchalska, P., and P. A. Crawford. 2017. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism* 25:262–284.
- Pulikanti, R., E. D. Peebles, R. W. Keirs, L. W. Bennett, M. M. Keralapurath, and P. D. Gerard. 2010. Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation 1 2. *Poultry Science* 89:860–865.
- Quan, T. H., and S. Benjakul. 2019. Duck egg albumen: physicochemical and functional properties as affected by storage and processing. *J Food Sci Technol* 56:1104–1115.
- Rabah, S. A., I. L. Gowan, M. Pagnin, N. Osman, and S. J. Richardson. 2019. Thyroid Hormone Distributor Proteins During Development in Vertebrates. *Front. Endocrinol.* 10:506.
- Ramirez, D. ., C. . Arboleda, and L. . Ecsote. 1976. The cytogenetics of intergeneric hybrids of *Anas bochas* and *Cairina moschata*. *Phillipine Agriculturalist*, 60, 6.
- Renaudeau, D., A. Collin, S. Yahav, V. de Basilio, J. L. Gourdine, and R. J. Collier. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6:707–728.
- Richards, S.-A. 1970. PHYSIOLOGY OF THERMAL PANTING IN BIRDS. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 10:151–168.
- Richards, M. P., M. Proszkowiec-Weglarz, R. W. Rosebrough, J. P. McMurtry, and R. Angel. 2010. Effects of early neonatal development and delayed feeding immediately post-hatch on the hepatic lipogenic program in broiler chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 157:374–388.
- Rizos, C. V., M. S. Elisaf, and E. N. Liberopoulos. 2011. Effects of thyroid dysfunction on lipid profile. *Open Cardiovasc Med J* 5:76–84.
- Robin, N., R. Babile, A. Peyhorgue, J. P. Dubois, and S. Leprettre. 2004. facteurs de production et qualité des foies gras de canards et d'oies. Editions Quae, production de canard, p. 157-165.
- Robin, N., A. Peyhorgue, and J. Castaing. 2002. Comparaison de différents itinéraires techniques élevage/gavage pour un gavage cours des canards mulards. 5èmes Journ Rech. Palmipèdes à Foie Gras, Pau, France, 148-151.
- Rocha, V. Z., and P. Libby. 2008. The Multiple Facets of the Fat Tissue. *Thyroid* 18:175–183.
- Roseboom, T. J., D. J. P. Barker, and O. P. Bleker. 2001. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*:6.

- Rousselot-Pailley, D., G. Guy, D. Gourichon, N. Sellier, and J. C. Blum. 1992. Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA Prod. Anim.* 5:167–172.
- Rousset-Akrim, S., M. C. Bayle, J. F. Martin, and C. Touraille. 1994. Comment distinguer par évaluation sensorielle les foies gras d'oie et de canard? Etude préliminaire. *Sciences des aliments*, 14, 6, p. 777-784.
- Rozenboim, I., Y. Piestun, N. Mobarkey, M. Barak, A. Hoyzman, and O. Halevy. 2004. Monochromatic light stimuli during embryogenesis enhance embryo development and posthatch growth. *Poultry Science* 83:1413–1419.
- Saadoun, A., and B. Leclercq. 1987. In vivo lipogenesis of genetically lean and fat chickens: effects of nutritional state and dietary fat. *The Journal of nutrition* 117:428–435.
- Saez, G., E. Baéza, S. Davail, D. Durand, D. Bauchart, and D. Gruffat. 2008. Is the hepatic metabolism of glucose and linoleic acid influenced by species in overfed ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151:576–581.
- Saez, G., S. Davail, G. Gentes, J. F. Hocquette, T. Jourdan, P. Degrace, and E. Baeza. 2009. Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poultry Science* 88:2382–2391.
- Saez, G., I. Savary-Auzeloux, E. Baeza, B. Marie-Dominique, S. Davail, D. Durand, D. Bauchart, and D. Gruffat. 2012. Fractional apoB-VLDL hepatic synthesis rate in Muscovy and Pekin ducks fed ad libitum. *Archiv Fur Geflugelkunde* 76:20–25.
- Saito, D., Q. Shi, H. Ando, and A. Urano. 2004. Attenuation of diurnal rhythms in plasma levels of melatonin and cortisol, and hypothalamic contents of vasotocin and isotocin mRNAs in pre-spawning chum salmon. *General and Comparative Endocrinology* 137:62–68.
- Salhanick, A. I., S. I. Schwartz, and J. M. Amatruda. 1991. Insulin inhibits apolipoprotein B secretion in isolated human hepatocytes. *Metabolism* 40:275–279.
- Saltiel, A. R., and C. R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806.
- Sampath, H., M. Miyazaki, A. Dobrzyn, and J. M. Ntambi. 2007. Stearoyl-CoA Desaturase-1 Mediates the Pro-lipogenic Effects of Dietary Saturated Fat. *J. Biol. Chem.* 282:2483–2493.
- Sanders, F. W. B., and J. L. Griffin. 2016. *De novo* lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose: Hepatic *de novo* lipogenesis and metabolic disease. *Biol Rev* 91:452–468.
- Sanin, Y. L., A. M. Z. Cabrera, and A. M. T. Morales. 2015. Adaptive Responses to Thermal Stress in Mammals. :15.
- Sauvant, D., J. M. Perez, and G. Tran. 2004. Tables INRA-AFZ de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage: 2ème édition. ISBN 2738011586, 306 p. INRA Editions Versailles.
- Sauveur, B. 1988. Reproduction des volailles et production d'oeufs. Editions INRA, Paris, France, 449p.

- Scanes, C. G. 2015. Chapter 18 - Carbohydrate Metabolism. Pages 421–441 in Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition). Scanes, C.G., ed. Sixth Edition. Academic Press, San Diego.
- Schultz, T. F. 2003. Circadian Clocks in Daily and Seasonal Control of Development. *Science* 301:326–328.
- Schulz, L. C. 2010. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:16757–16758.
- Scott, R. V., and S. . Bloom. 2018. Problem or solution: The strange story of glucagon. *Peptides* 100:36–41.
- Scott, M. L., M. C. Nesheim, R. J. Young, and others. 1969. Nutrition of the chicken. *Nutrition of the chicken*.
- Seki, Y., K. Sato, T. Kono, H. Abe, and Y. Akiba. 2003. Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. *General and Comparative Endocrinology* 133:80–87.
- Sellier, N., J.-M. Brun, M.-M. Richard, F. Batellier, V. Dupuy, and J.-P. Brillard. 2005. Comparison of fertility and embryo mortality following artificial insemination of common duck females (*Anas Platyrhynchos*) with semen from common or Muscovy (*Cairina Moschata*) drakes. *Theriogenology* 64:429–439.
- Seppälä-Lindroos, A., S. Vehkavaara, A.-M. Häkkinen, T. Goto, J. Westerbacka, A. Sovijärvi, J. Halavaara, and H. Yki-Järvinen. 2002. Fat Accumulation in the Liver Is Associated with Defects in Insulin Suppression of Glucose Production and Serum Free Fatty Acids Independent of Obesity in Normal Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87:3023–3028.
- Servière, J., M. Carriere, C. Duvaux-Ponter, G. Guy, and S. Roussel. 2011. Neurogenic inflammation in the upper digestive tract of the mule duck: effect of a chemical algogen and force-feeding. *British Poultry Science* 52:792–799.
- Setiawan, A. 1994. Etudes comparatives de différents types génétiques de canards mulards : croissance, composition corporelle et tissulaire, et qualité des produits obtenus avant et après gavage. Thèse de Doctorat en Sciences Qualité des Aliments, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 274p.
- Shafey, T. M., and T. H. Al-mohsen. 2002. Embryonic Growth, Hatching Time and Hatchability Performance of Meat Breeder Eggs Incubated under Continuous Green Light. *Asian-Australas J Anim Sci* 15:1702–1707.
- Shbailat, S. J., and R. A. Abuassaf. 2018. Transfer of egg white proteins and activation of proteases during the development of *Anas platyrhynchos domestica* embryo. *Acta Biologica Hungarica* 69:72–85.
- Shinder, D., M. Ruzal, M. Giloh, S. Druyan, Y. Piestun, and S. Yahav. 2011. Improvement of cold resistance and performance of broilers by acute cold exposure during late embryogenesis. *Poultry Science* 90:633–641.
- Shutze, J. V., J. K. Lauber, M. Kato, and W. O. Wilson. 1962. Influence of Incandescent and Coloured Light on Chicken Embryos during Incubation. *Nature* 196:594–595.

- Siegel, P. B., S. T. Isakson, F. N. Coleman, and B. J. Huffman. 1969. Photoacceleration of development in chick embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology* 28:753–758.
- Silva, J. E. 2003. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Annals of internal medicine* 139:205–213.
- Silva, J. E. 2006. Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. *Physiological Reviews* 86:435–464.
- Simon, J., N. Rideau, M. Taouis, and J. Dupont. 2011. Plasma insulin levels are rather similar in chicken and rat. *General and Comparative Endocrinology* 171:267–268.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo, and M. J. Czaja. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458:1131–1135.
- Siuta-Manganot, P., D. R. Janeros, and M. D. Lane. 1982. Association and Assembly of Triglyceride and Phospholipid with Glycosylated and Unglycosylated Apoproteins of Very Low Density Lipoprotein in the Intact Liver Cell. :5.
- Slack, J. M. W. 1991. *From Egg To Embryo*. Cambridge.
- Snoeck, A., C. Remacle, B. Reusens, and J. J. Hoet. 1990. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biology of the neonate* 57 2:107–18.
- Somero, G. N. 2010. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301:R1–R14.
- Sparks, D., and E. Sparks. 1989. Insulin Modulation of Hepatic Synthesis and Secretion of Apolipoprotein B by Rat Hepatocytes”. :10.
- Speake, B. K., A. M. Murray, and R. C. Noble. 1998a. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Progress in lipid research* 37:1–32.
- Speake, B. K., A. M. Murray, and R. C. Noble. 1998b. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.* 37:1–32.
- Stahl, A. 2004. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflügers Archiv* 447:722–727.
- Stevenson, T. J., and B. J. Prendergast. 2013. Reversible DNA methylation regulates seasonal photoperiodic time measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:16651–16656.
- Stock, M. J. 1989. The role of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Proc. Nutr. Soc.* 48:189–196.
- Stremmel, W., G. Strohmeyer, F. Borchard, S. Kochwa, and P. D. Berk. 1985. Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4–8.

- Suksaweang, S., C.-M. Lin, T.-X. Jiang, M. W. Hughes, R. B. Widelitz, and C.-M. Chuong. 2004a. Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of  $\beta$ -catenin/Wnt in size regulation. *Developmental Biology* 266:109–122.
- Suksaweang, S., C.-M. Lin, T.-X. Jiang, M. W. Hughes, R. B. Widelitz, and C.-M. Chuong. 2004b. Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. *Dev. Biol.* 266:109–122.
- Sunny, N. E., and B. J. Bequette. 2011. Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos<sup>1,2,3</sup>. *Journal of Animal Science* 89:3945–3953.
- Surks, M. I., A. R. Schadow, J. M. Stock, and J. H. Oppenheimer. 1973. Determination of lodothyronine Absorption and Conversion of L-Thyroxine (T4) to L-Triiodothyronine (T3) using Turnover Rate Techniques. :7.
- Svoboda, M., M. Tastenoy, P. Vertongen, and P. Robberecht. 1994. Relative quantitative analysis of glucagon receptor mRNA in rat tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology* 105:131–137.
- Sweazea, K. L., and E. J. Braun. 2006. Glucose transporter expression in English sparrows (*Passer domesticus*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 144:263—270.
- Tai, C., and R. Rouvier. 1998. Crossbreeding effect on sexual dimorphism of body weight in intergeneric hybrids obtained between Muscovy and Pekin duck. :9.
- Tamzil, M. H., R. R. Noor, P. S. Hardjoswor, W. Manalu, and C. Sumantri. 2013. Acute Heat Stress Responses of Three Lines of Chickens with Different Heat Shock Protein (HSP)-70 Genotypes. *International J. of Poultry Science* 12:264–272.
- Tancharoenrat, P., V. Ravindran, F. Zaefarian, and G. Ravindran. 2014. Digestion of fat and fatty acids along the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Poultry Science* 93:371–379.
- Tao, X., Z. Y. Zhang, H. Dong, H. Zhang, and H. Xin. 2006. Responses of Thyroid Hormones of Market-Size Broilers to Thermoneutral Constant and Warm Cyclic Temperatures. *Poultry Science* 85:1520–1528.
- Tarry-Adkins, J. L., J. H. Chen, N. S. Smith, R. H. Jones, H. Cherif, and S. E. Ozanne. 2009. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to telomere shortening and increased markers of cell senescence in rat islets. *The FASEB Journal* 23:1521–1528.
- Tarry-Adkins, J. L., and S. E. Ozanne. 2011. Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions. *American Journal of Clinical Nutrition* 94:1765S-1771S.
- Tavernier, A., S. Davail, M. Houssier, M.-D. Bernadet, K. Ricaud, and K. Gontier. 2020. Inter genotype differences in expression of genes involved in glucose metabolism in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Molecular Biology Reports* 47:1527–1533.
- Tavernier, A., S. Davail, K. Ricaud, M.-D. Bernadet, and K. Gontier. 2017a. Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 424:147–161.

- Tavernier, A., S. Davail, K. Ricaud, M.-D. Bernadet, and K. Gontier. 2017b. Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 424:147–161.
- Tchelycheva, L. A., P. Delpéch, C. P. Popescu, and A. V. Rodionov. 1993. Arrêt de la condensation chromosomique chez l'hybride interspécifique entre cane commune et canard de Barbarie, le mulard. *Ann. Génét.*, 36, 190-193.
- Terim Kapakin, K. A., H. Imik, R. Gumus, S. Kapakin, and Y. S. Saglam. 2013. Effect of Vit E on Secretion of HSP-70 in Testes of Broilers Exposed to Heat Stress. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* Available at [http://vetdergi.kafkas.edu.tr/extdocs/2013\\_2/305-310.pdf](http://vetdergi.kafkas.edu.tr/extdocs/2013_2/305-310.pdf) (verified 11 July 2018).
- Tesseraud, S., and S. Temim. 1999. Modifications métaboliques chez le poulet de chair en climat chaud : conséquences nutritionnelles.
- Teulier, L., J.-L. Rouanet, D. Letexier, C. Romestaing, M. Belouze, B. Rey, C. Duchamp, and D. Roussel. 2010. Cold-acclimation-induced non-shivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency. *Journal of Experimental Biology* 213:2476–2482.
- Theron, L., M. Cullere, M. Bouillier-Oudot, H. Manse, A. Dalle Zotte, C. Molette, X. Fernandez, and Z. G. Vitezica. 2012. Modeling the relationships between quality and biochemical composition of fatty liver in mule ducks<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 90:3312–3317.
- Theron, L., X. Fernandez, N. Marty-Gasset, C. Pichereaux, M. Rossignol, C. Chambon, D. Viala, T. Astruc, and C. Molette. 2011. Identification by proteomic analysis of early post-mortem markers involved in the variability in fat loss during cooking of mule duck “foie gras.” *J. Agric. Food Chem.* 59:12617–12628.
- Thommes, R. 1987. Ontogenesis of thyroid function and regulation in the developing chick embryo. *The Journal of experimental zoology. Supplement : published under auspices of the American Society of Zoologists and the Division of Comparative Physiology and Biochemistry* 1:273—279.
- Thommes, R. C., and J. J. Just. 1964. ENDOCRINE CONTROL OF YOLK SAC MEMBRANE GLYCOGEN LEVELS IN THE DEVELOPING CHICK EMBRYO. I. GLUCAGON. *Gen. Comp. Endocrinol.* 4:614–623.
- Thorens, B., Z. Q. Cheng, D. Brown, and H. F. Lodish. 1990. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 259:C279–C285.
- Tona, K., O. Onagbesan, V. Bruggeman, A. Collin, C. Berri, M. J. Duclos, S. Tesseraud, J. Buyse, E. Decuyper, and S. Yahav. 2007. Effects of heat conditioning at d 16 to 18 of incubation or during early broiler rearing on embryo physiology, post-hatch growth performance and heat tolerance. :9.
- Tong, Q., I. M. McGonnell, T. G. M. Demmers, N. Roulston, H. Bergoug, C. E. Romanini, R. Verhelst, M. Guinebretière, N. Eterradossi, D. Berckmans, and V. Exadaktylos. 2018. Effect of a photoperiodic green light programme during incubation on embryo development and hatch process. *Animal* 12:765–773.

- Torres, D. M., and S. A. Harrison. 2008. Diagnosis and Therapy of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 134:1682–1698.
- Tzschentke, B. 2007. Attainment of Thermoregulation as Affected by Environmental Factors1. *Poultry Science* 86:1025–1036.
- Tzschentke, B. 2008. Monitoring the development of thermoregulation in poultry embryos and its influence by incubation temperature. *Computers and Electronics in Agriculture* 64:61–71.
- Tzschentke, B., and D. Basta. 2002. Early development of neuronal hypothalamic thermosensitivity in birds: influence of epigenetic temperature adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131:825–832.
- Ulrich-Lai, Y., and J. Herman. 2009. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397-409. *Nature reviews. Neuroscience* 10:397–409.
- Unger, R. H. 1991. Glucose Transport in Pancreatic  $\beta$ Cells. 251:6.
- Uni, U., Zehava (Nes-Ziona, IL), Ferket, Peter R. (Raleigh, NC. 2014. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding of enteric modulators. Available at <http://www.freepatentsonline.com/8734837.html>.
- Uni, Z., P. R. Ferket, E. Tako, and O. Kedar. 2005. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science* 84:764–770.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40:e115–e115.
- Van der Waaij, E., H. Van den Brand, J. Van Arendonk, and B. Kemp. 2011. Effect of match or mismatch of maternal–offspring nutritional environment on the development of offspring in broiler chickens. *Animal* 5:741–748.
- Vickers, M. H., B. H. Breier, W. S. Cutfield, P. L. Hofman, and P. D. Gluckman. 2000. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 279:E83–E87.
- Visschedijk, A. H. J. 1991. Physics and physiology of incubation. *British Poultry Science* 32:3–20.
- Visser, W. E., E. C. H. Friesema, and T. J. Visser. 2011. Minireview: Thyroid Hormone Transporters: The Knowns and the Unknowns. *Molecular Endocrinology* 25:1–14.
- Wagstaff, P., H. Y. Kang, D. Mylott, P. J. Robbins, and M. K. White. 1995. Characterization of the avian GLUT1 glucose transporter: differential regulation of GLUT1 and GLUT3 in chicken embryo fibroblasts. *Mol Biol Cell* 6:1575–1589.
- Walter, J. H., and R. A. Voitle. 1972. Effects of Photoperiod During Incubation on Embryonic and Post-Embryonic Development of Broilers1. *Poultry Science* 51:1122–1126.
- Walter, J. H., and R. A. Voitle. 1973. Effects of photoperiod during incubation on embryonic and post-embryonic development of quail and chickens. *British Poultry Science* 14:533–540.

- Wang, H., and R. H. Eckel. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 297:E271–E288.
- Wang, G., J. Liu, S. Xiang, X. Yan, Q. Li, C. Cui, L. Li, and H. Liu. 2014. Influence of in ovo thermal manipulation on lipid metabolism in embryonic duck liver. *Journal of Thermal Biology* 43:40–45.
- Wang, Y., M. C. McNutt, S. Banfi, M. G. Levin, W. L. Holland, V. Gusarova, J. Gromada, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2015. Hepatic ANGPTL3 regulates adipose tissue energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:11630.
- Wang, M. Y., M. Y. Tsai, and C. Wang. 1994. Identification of Chicken Liver Glucose Transporter. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310:172–179.
- Wang, J., Y. Wang, X. Li, J. Li, and F. C. Leung. 2008. Cloning, Tissue Distribution, and Functional Characterization of Chicken Glucagon Receptor. *Poultry Science* 87:2678–2688.
- Weber, J.-M. 2009. The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *J. Exp. Biol.* 212:593.
- Willemsen, H., B. Kamers, F. Dahlke, H. Han, Z. Song, Z. Ansari Pirsaraei, K. Tona, E. Decuypere, and N. Everaert. 2010. High- and low-temperature manipulation during late incubation: Effects on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broilers. *Poultry Science* 89:2678–2690.
- Wu, X., and H. H. Freeze. 2002. GLUT14, a Duplicon of GLUT3, Is Specifically Expressed in Testis as Alternative Splice Forms. *Genomics* 80:553–557.
- Wu, D., J. Xu, E. Song, S. Tang, X. Zhang, N. Kemper, J. Hartung, and E. Bao. 2015. Acetyl salicylic acid protected against heat stress damage in chicken myocardial cells and may associate with induced Hsp27 expression. *Cell Stress and Chaperones* 20:687–696.
- Xu, J., S. Tang, E. Song, B. Yin, and E. Bao. 2017. Inhibition of heat shock protein 70 intensifies heat-stressed damage and apoptosis of chicken primary myocardial cells in vitro. *Molecular Medicine Reports* 15:2881–2889.
- Yadgary, L., A. Cahaner, O. Kedar, and Z. Uni. 2010a. Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. *Poultry Science* 89:2441–2452.
- Yadgary, L., A. Cahaner, O. Kedar, and Z. Uni. 2010b. Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. *Poultry Science* 89:2441–2452.
- Yadgary, L., and Z. Uni. 2012. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. *Poultry Science* 91:444–453.
- Yahav, S. 1999. Effect of early-age thermal conditioning and food restriction on performance and thermotolerance of male broiler chickens. *British Poultry Science* 40:120–126.
- Yahav, S., and J. Brake. 2014. Chick Embryogenesis: A Unique Platform to Study the Effects of Environmental Factors on Embryo Development. *Journal of stem cells* 9:17.

- Yahav, S., A. Collin, D. Shinder, and M. Picard. 2004a. Thermal manipulations during broiler chick embryogenesis: Effects of timing and temperature. *Poultry science* 83:1959–1963.
- Yahav, S., and S. Hurwitz. 1996. Induction of Thermotolerance in Male Broiler Chickens by Temperature Conditioning at an Early Age. *Poultry Science* 75:402–406.
- Yahav, S., and J. P. McMurtry. 2001. Thermotolerance Acquisition in Broiler Chickens by Temperature Conditioning Early in Life—The Effect of Timing and Ambient Temperature<sup>1</sup>. *Poultry Science* 80:1662–1666.
- Yahav, S., R. S. Rath, and D. Shinder. 2004b. The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. *Journal of Thermal Biology* 29:245–250.
- Yarnell, G. R., P. A. Nelson, and S. R. Wagle. 1966. Biochemical studies of the developing embryo: I. Metabolism of gluconeogenic precursors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 114:539–542.
- Yeager, R. L., J. A. Franzosa, D. S. Millsap, J. L. Angell-Yeager, S. S. Heise, P. Wakhungu, J. Lim, H. T. Whelan, J. T. Eells, and D. S. Henshel. 2005. Effects of 670-nm Phototherapy on Development. *Photomedicine and Laser Surgery* 23:268–272.
- Yen, C.-L., S. Stone, S. Koliwad, C. Harris, and R. Farese. 2008. Thematic Review Series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of lipid research* 49:2283–301.
- Yossifoff, M., T. Kisliouk, and N. Meiri. 2008. Dynamic changes in DNA methylation during thermal control establishment affect CREB binding to the brain-derived neurotrophic factor promoter: Epigenetic regulation of *Bdnf* expression. *European Journal of Neuroscience* 28:2267–2277.
- Zaboli, G.-R., S. Rahimi, F. Shariatmadari, M. A. K. Torshizi, A. Baghbanzadeh, and M. Mehri. 2017. Thermal manipulation during Pre and Post-Hatch on thermotolerance of male broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Poultry Science* 96:478–485.
- Zaret, K. S. 2002. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nature Reviews Genetics* 3:499–512.
- Zeman, M., and E. Gwinner. 1993. Ontogeny of the rhythmic melatonin production in a precocial and an altricial bird, the Japanese quail and the European starling. *Journal of Comparative Physiology A* 172:333–338.
- Zeman, M., E. Gwinner, I. Herichová, D. Lamošová, and L. Košťál. 1999. Perinatal development of circadian melatonin production in domestic chicks. *J Pineal Res* 26:28–34.
- von Zglinicki, T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences* 27:339–344.
- Zhao, F.-Q., and A. Keating. 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *CG* 8:113–128.
- Zuidhof, M. J., B. L. Schneider, V. L. Carney, D. R. Korver, and F. E. Robinson. 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science* 93:2970–2982.

# Annexes

## Liste des annexes

1. Article pour les Treizièmes journées de la recherche avicole et palmipèdes à foie gras (20 et 21 Mars 2019) :

*Impact d'une manipulation thermique embryonnaire sur la production de foie gras des canards mulard.* **William Massimino**, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Cécile Bonnefont, Hélène Manse, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier

2. Résumé pour le « XVème European Poultry Conference de DUBROVNIK, CROATIA » (17 au 21 septembre 2018) :

*Impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in ducks.* **William Massimino**, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Cécile Bonnefont, Hélène Manse, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier

3. Résumé et poster pour le congrès "Fundamental physiology and Perinatal development in Poultry and Incubation and Fertility Research Group" (Combined workshop IFRG-PDP 2019), Tours, France (28 au 30 août 2019) :

*Liver ontogeny in mule ducks: determination of the best embryonic thermal programming window.* **Massimino William**, Davail Stéphane, Pioche Tracy, Ricaud Karine, Gontier Karine, Morisson Mireille, Collin Anne, Bernardet Marie-Dominique, Panserat Stéphane, Houssier Marianne

4. Poster présenté lors des journées de l'école doctorale 2017

# IMPACT D'UNE MANIPULATION THERMIQUE PENDANT L'EMBRYOGENESE SUR LA PRODUCTION DE FOIE GRAS DES CANARDS MULARDS

**William Massimino<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>2</sup>, Tracy Pioche<sup>1</sup>,  
Karine Ricaud<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>, Cécile Bonnefont<sup>3</sup>, Hélène Manse<sup>3</sup>, Mireille Morisson<sup>3</sup>,  
Anne Collin<sup>4</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme,  
Aquaculture, F-64310 SAINT PEE SUR NIVELLE,*

<sup>2</sup>*UE-PFG-UE89, Centre INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale sur les Palmipèdes  
à Foie Gras), Domaine d'Artiguères, 1076, route de Haut Mauco, F-40280 BENQUET,*

<sup>3</sup>*GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, F-31326 CASTANET TOLOSAN*

<sup>4</sup>*UMR-BOA, Centre INRA Val de Loire, F-37380 NOUZILLY*

[william.massimino@univ-pau.fr](mailto:william.massimino@univ-pau.fr)

## RÉSUMÉ

Différentes études ont montré que des événements survenus très tôt dans la vie d'un animal pouvaient avoir des effets de « programmation » sur la physiologie de l'adulte. L'exposition d'embryons de volaille à des températures d'incubation élevées améliore leur capacité de survie lors de pics de chaleur à l'âge adulte. Récemment, il a été démontré que la manipulation thermique embryonnaire (MT) avait un impact sur le développement musculaire et le métabolisme hépatique chez les canards Pékin. Dans cette étude, notre objectif était de mesurer l'impact d'une élévation de la température d'incubation sur le développement, la croissance et les performances des canards mulards, principalement utilisés pour la production de foie gras. Nous avons testé trois modalités expérimentales d'augmentation de la température dans l'incubateur sur des embryons de canards mulards, parallèlement un groupe témoin était maintenu à température constante tout au long de l'embryogenèse. Une éclosion plus précoce a été observée pour tous les groupes soumis à une MT (1 jour d'avance en moyenne). Des changements significatifs de la température et du poids corporels ont été mesurés à l'éclosion et tout au long de l'élevage. Enfin, le gavage a entraîné une augmentation significative du poids vif, des muscles de la cuisse, du tissu adipeux et du foie dans tous les groupes traités, tandis qu'une MT embryonnaire augmentait de manière significative le poids de graisse abdominale (jusqu'à +13,3% ; P=0,0001) et du foie (jusqu'à +16,9% ; P<0,0001), par rapport au groupe contrôle (sans MT) gavé. Ces résultats suggèrent que la MT embryonnaire peut améliorer la production de foie gras chez le canard mulard, mais ses effets potentiels sur l'éclosabilité doivent être approfondis.

## ABSTRACT

### **Impact of embryonic thermal manipulation on fatty liver production in mule ducks**

Previous studies have shown that very early life events could have programming effects on adult physiology. Exposing poultry embryos to higher incubation temperatures improve their survival capacity to thermal challenge in adulthood. Recently, embryonic thermal manipulation (TM) has been shown to impact muscle development and hepatic metabolism in Pekin ducks. In this study, we aimed to test whether rising incubation temperature has an impact on development, growth and zootechnical performances in mule ducks, mainly used for fatty liver production. Different thermal incubation conditions were applied during embryogenesis on mule duck eggs with three TM groups and one control, for which the temperature was maintained stable throughout. A faster embryonic and growth development was observed for all TM groups. Significant changes in body temperature and body weight were measured at hatching time and throughout the breeding period. Finally, overfeeding induced significant increase of live body weight, leg muscle, fat, and liver weights in all groups, while embryonic TM significantly increased abdominal fat and liver weights compared to control overfed group. These results suggest that embryonic TM can improve fatty liver production in male mule ducks, nevertheless potential deleterious effects on eclosability need to be explored further.

## INTRODUCTION

La production de foie gras nécessite de soumettre les canards à une période de gavage, principalement avec du maïs. Cette alimentation riche en glucides stimule la lipogenèse *de novo* et induit une stéatose hépatique (Saadoun and Leclercq, 1987; Hermier *et al.*, 1991; Fernandez *et al.*, 2011). À la fin de la période de gavage le poids de foie est généralement multiplié par 10 avec plus de 50% de lipides, alors que ceux-ci ne représentent que 5% chez les canards non-gavés. Les pressions sociétales se faisant de plus en plus fortes, les travaux scientifiques s'orientent vers la recherche d'alternatives au gavage ou de réduction de la durée de la période de gavage. C'est donc dans l'optique d'améliorer la production de foie gras tout en respectant le bien-être animal que nous avons réalisé cette étude.

L'embryogenèse, étant extracorporelle chez les volailles, est donc facilement affectée par les facteurs environnementaux. La température est considérée comme l'un des facteurs les plus influents sur le développement embryonnaire, l'éclosion et la croissance post-embryonnaire chez l'oiseau (DuRant *et al.*, 2011; Yahav and Brake, 2014; Li *et al.*, 2017;). Au cours des 50 dernières années, l'augmentation de la productivité résultant de la génétique, la nutrition et de l'amélioration dans la gestion d'ambiance ont permis de réduire considérablement le temps nécessaire pour atteindre le poids du marché chez les poulets de chair (Zuidhof *et al.*, 2014). Malheureusement, ces améliorations des performances de croissance ont été effectuées au détriment des capacités cardiovasculaire et respiratoire des oiseaux, entraînant une sensibilité accrue aux stress thermiques, provoqués par des températures et une humidité élevées (Renaudeau *et al.*, 2012; Terim Kapakin *et al.*, 2013). Il a été montré que les poulets s'adaptent mieux au stress thermique pendant l'élevage si des manipulations de la température et de l'humidité sont appliquées au cours de la période précédant l'éclosion (Decuypere and Bruggeman, 2007; Renaudeau *et al.*, 2012). Ainsi la manipulation thermique embryonnaire améliore la thermo-tolérance du poulet de chair sans modifier le développement de l'embryon et réduit de 50% la mortalité lors d'une exposition à la chaleur aigue (Piestun *et al.*, 2008a). En outre, une augmentation de 1,7°C pendant 12h/24h, du 7<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (E7) à E16 induit une augmentation du poids de filet (+1%) chez le poulet (Piestun *et al.*, 2013), parallèlement à une diminution du taux de gras abdominal (Loyau *et al.*, 2013), tandis qu'une augmentation de 1°C pendant 4 jours lors des premiers stades d'incubation conduit à d'avantage de fibres musculaires à l'éclosion chez la dinde (Ashton *et al.*, 2005). Cette manipulation, également définie comme une « programmation thermique », fait partie du processus plus vaste de « programmation » basé sur les changements permanents causés par diverses manipulations de l'environnement au cours d'une période critique caractérisée par une grande plasticité des systèmes de

commande physiologiques (Decuypere and Bruggeman, 2007; Willemsen *et al.*, 2010). Ces résultats indiquent que la programmation embryonnaire peut avoir un effet physiologique à long terme et induire des gains potentiels en poids vifs intéressants économiquement.

Très peu de données relatives à l'effet des MT embryonnaires sont disponibles chez les canards. Des résultats obtenus chez le canard Pékin montrent une inhibition du développement des muscles du *pectoralis major* pendant l'embryogenèse ainsi qu'à l'éclosion, après une augmentation de 1°C en fin d'incubation (Li *et al.*, 2017). Néanmoins, l'augmentation de la température d'incubation de 1°C 24h/24 pendant les jours embryonnaires E11 à E24 entraîne une augmentation du poids du foie deux semaines après l'éclosion (Liu *et al.*, 2015) et une augmentation de l'activité et de l'expression de la FAS (fatty acid synthase) hépatique qui est une enzyme impliquée dans la lipogenèse (Wang *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que la manipulation thermique embryonnaire chez les canards Pékin pourrait améliorer le stockage des lipides dans le foie, au moins à court terme. À notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur des manipulations thermiques embryonnaires chez le canard mulard génotype connu pour présenter un engraissement principalement hépatique (Chartrin *et al.*, 2006). Cette étude vise à déterminer les effets de la manipulation thermique embryonnaire chez le canard mulard afin de mesurer son impact sur le métabolisme du foie et la production de foie gras.

## 1. MATERIELS ET METHODES

Le protocole mis en place a reçu un avis favorable du comité d'éthique du Grand Sud-Ouest (n°73) sous la référence du dossier 201805250850236-v3.

### 1.1. Dispositif expérimental

Pour cette étude nous avons utilisé 2000 œufs de canards mulards de type génétique H85 provenant de la société Grimaud Frères Sélection (3 la corbière – Roussay, 49450 Sèvremoine, France). Ces œufs ont été répartis dans 4 incubateurs différents de l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras (INRA, UEPPG), correspondant à 4 modalités expérimentales (500 œufs/groupe) : un groupe contrôle et 3 groupes manipulés thermiquement (MT). Les conditions d'incubation des 4 groupes expérimentaux ont été : T1 (contrôle) : incubation à température (37,6°C, 24h/24h) et hygrométrie (47%) constantes pendant toute la durée d'incubation ; groupe T2 : incubation à 38,6 °C 24h/24h de E13 à E27 ; groupe T3 : incubation à 38,6°C 16h/24h de E13 à E27 ; et groupe T4 incubation à 39,1°C 16h/24h de E13 à E27. L'hygrométrie a été ajustée à 63% pour les 3 groupes MT. Les canetons ont été identifiés à l'éclosion par une bague alaire et répartis dans 8 loges à raison de 2 loges par groupe et de 100 animaux par loge. Les animaux ont été nourris *ad libitum* avec un aliment de démarrage de 0 à 4 semaines d'âge (EMA 2800 Kcal,

17,5% PB), puis avec un aliment de croissance de 4 à 8 semaines d'âge (EMA 2800 Kcal, 15,5% PB). A partir de la 8<sup>ème</sup> semaine, un rationnement horaire est pratiqué pour la période de finition jusqu'à la mise en gavage avec une distribution *ad libitum* 1h/jour. A l'âge de 12 semaines, les canards prêts à gaver (PAG) ont été placés en cages collectives pour un gavage en 21 repas, avec 53% de mix (98% maïs) et 47 % d'eau.

### 1.2. Mesures

La consommation alimentaire par loge, la température corporelle, le poids vif individuel des animaux et l'éclosabilité ont été relevés à l'éclosion, puis toutes les 2 semaines, jusqu'à l'abattage après gavage. A 15 jours d'élevage, 30 mâles par traitements ont été prélevés aléatoirement et abattus pour réaliser des mesures anatomiques. La cuisse droite, le foie, le *pectoralis major* et le gras abdominal ont été prélevés et pesés. Avant gavage (J83), 40 animaux (choisis aléatoirement) par groupe ont abattus, puis 52 après gavage (J95) pour réaliser les mêmes analyses.

### 1.3. Analyses statistiques

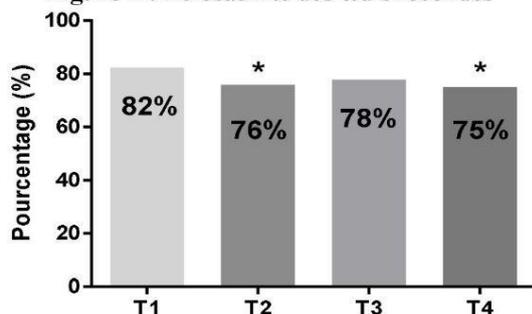
Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.01. Un test de Chi<sup>2</sup> a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats d'éclosabilité. Les autres données zootechniques et anatomiques ont fait l'objet d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA). Lorsque les effets des facteurs étaient significatifs, les comparaisons de moyennes 2 à 2 ont été réalisées au moyen du test de Tukey.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1 Résultats d'éclosion

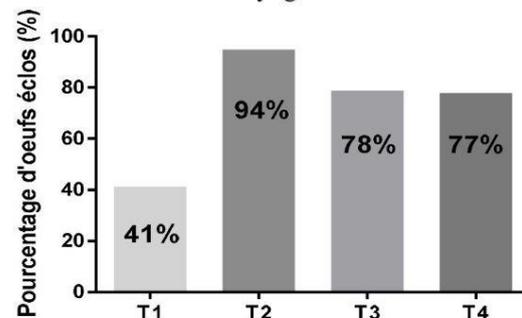
Une modification de la température d'incubation peut avoir un impact très différent sur l'éclosabilité, selon la période, la durée ou le degré de variation (Collin *et al.*, 2005; Piestun *et al.*, 2008a, 2008b). Dans cette étude, nous mesurons une diminution significative du taux d'éclosion pour les 2 groupes ayant subi les plus fortes manipulations thermiques (76% et 75% pour T2 et T4 respectivement contre 82% chez les contrôles), mais nous n'observons pas de diminution significative dans le groupe T3 (Figure 1). Ces résultats confirment des résultats antérieurs (Piestun 2008) indiquant qu'une augmentation continue de la température durant toute la période d'incubation affecte plus l'éclosabilité qu'une augmentation discontinue.

Figure 1 : Éclosabilité des œufs fécondés



Nos résultats suggèrent également que les canards seraient plus sensibles que les poulets à une augmentation modérée de la température d'incubation. Par ailleurs, 70 à 95% des animaux ayant subi une manipulation thermique sont éclos au 29<sup>ème</sup> jour d'embryogenèse, contre seulement 40% pour le groupe contrôle (figure 2). Ce résultat confirme que l'augmentation de la température d'incubation accélère le développement embryonnaire (Durant 2013). Cette étude contribuera à perfectionner les conditions de manipulation thermique pour assurer une éclosion optimale dans ce modèle.

Figure 2 : Éclosion des œufs au 29<sup>ème</sup> jour d'embryogenèse



### 2.2 Performances zootechniques en condition d'élevage et de gavage

L'évolution de la température corporelle externe des canards, de l'éclosion jusqu'en fin de gavage, est présentée dans le tableau 1. Nous observons une baisse significative de la température chez les trois groupes MT comparés au groupe contrôle, depuis l'éclosion jusqu'au 59<sup>ème</sup> jours d'âge. Ces premiers résultats chez le canard confirment ceux de nombreuses études obtenus chez les poulets, relevant une baisse moyenne de température de 0,2°C jusqu'à 28 jours post-éclosion (Loyau *et al.*, 2015). En fin de gavage, plus aucune différence de température corporelle n'est observée. L'impact du gavage sur le métabolisme est très important et pourrait induire une augmentation de la thermogénèse (Guémené *et al.*, 2006), ce qui pourrait expliquer une stabilisation de la température corporelle pour tous les groupes.

L'évolution des poids vifs des canards mulards des 4 groupes du 1<sup>er</sup> au 95<sup>ème</sup> jour est présenté sur le tableau 2. Nous observons une diminution significative du poids vif moyen des canetons à l'éclosion pour les 3 groupes ayant subi une MT par rapport au groupe contrôle, comme précédemment rapporté chez le poulet (Al-Rukibat *et al.*, 2017; Zaboli *et al.*, 2017). Cependant, dès la deuxième semaine les canetons des 3 groupes ayant subi une MT ont compensé la différence de poids vif initiale, puis excède celui des contrôles entre J45 et J59. Les différences s'estompent totalement au moment de la mise en gavage. Cette augmentation de poids vif pendant l'élevage pourrait être liée à une croissance musculaire plus rapide du *pectoralis major*, dont nous avons mesuré une augmentation dans deux des groupes traités à deux semaines d'âge (Tableau 3).

**Tableau 1.** Moyenne et écart-types de la température corporelle externe par jours et par traitement

Température moyenne (°C)	J1	J31	J45	J59	J70	J83	J95
Nombre d'animaux	123-150	94-96	94-96	92-95	90-95	90-95	48-52
Contrôle	39,03 ± 1,10	35,24 ± 1,41	33,75 ± 1,92	33,34 ± 1,68	31,91 ± 1,55	34,76 ± 1,53	34,81 ± 1,18
+1°C 24h/24h, (E13 à E27)	38,58 ± 0,73 (***)	35,42 ± 1,16 (ns)	32,48 ± 2,26 (***)	31,03 ± 1,86 (****)	31,36 ± 1,86 (ns)	34,93 ± 1,95 (ns)	35,05 ± 0,94(ns)
+1°C 16h/24h, (E13 à E27)	38,56 ± 0,55 (***)	35,19 ± 1,24 (ns)	31,77 ± 2,19 (****)	30,50 ± 1,63 (****)	31,96 ± 1,73 (ns)	34,85 ± 2,12 (ns)	34,72 ± 1,43 (ns)
+1,5°C 16h/24h, (E13 à E27)	38,20 ± 0,46 (***)	35,39 ± 1,30 (ns)	32,26 ± 2,32 (****)	30,64 ± 1,67 (****)	32,51 ± 1,42 (*)	33,99 ± 2,77 (*)	34,68 ± 1,43 (ns)

\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* : Effet significatif respectivement à P<0,05 ; <0,01 ; <0,001 ; <0,0001

**Tableau 2.** Moyenne et écart-types du poids vif des canards mulards par jours et par traitement

Poids vif moyen (g)	J1	J31	J45	J59	J70	J83	J95
Nombre d'animaux	123-150	94-96	94-96	92-95	90-95	90-95	48-52
Contrôle	48,16 ± 3,60	1669 ± 130	2622 ± 218	3684 ± 285	4167 ± 343	4562 ± 378	6102 ± 391
+1°C 24h/24h, (E13 à E27)	42,60 ± 4,82 (****)	1713 ± 158 (ns)	2824 ± 235 (****)	3943 ± 322 (****)	4351 ± 373 (***)	4683 ± 400 (ns)	6183 ± 405 (ns)
+1°C 16h/24h, (E13 à E27)	44,70 ± 3,79 (****)	1646 ± 136 (ns)	2770 ± 223 (****)	3808 ± 278 (*)	4181 ± 317 (ns)	4522 ± 366 (ns)	6144 ± 405 (ns)
+1,5°C 16h/24h, (E13 à E27)	43,88 ± 4,55 (****)	1719 ± 161 (ns)	2760 ± 254 (***)	3865 ± 296 (***)	4240 ± 330 (ns)	4576 ± 392 (ns)	6127 ± 448 (ns)

\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* : Effet significatif respectivement à P<0,05 ; <0,01 ; <0,001 ; <0,0001

Ces données confirment les résultats déjà observés chez le poulet et le canard révélant une augmentation du poids de muscle (Piestun *et al.*, 2011, 2013; Loyau *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). En revanche, nous n'avons observé aucune différence de poids du foie à 15 jours post-éclosion. Lors de la mise en gavage, un groupe traité présente encore une augmentation du poids de muscle pectoral (T2), et deux d'entre eux une augmentation du gras abdominal (T2 et T4, Tableau 3). Comme attendu, le gavage induit une prise de poids significative pour le gras abdominal, la cuisse et le foie, dans les quatre groupes. Le gain de poids corporel et l'indice de consommation pendant la période de gavage n'étaient pas significativement différents (non montrés). Après gavage, la MT induit une augmentation significative du poids de gras abdominal pour tous les groupes MT (Tableau 3). De façon plus intéressante, la manipulation thermique embryonnaire augmente significativement le poids des foies gras pour les 3 groupes MT par rapport au groupe contrôle, jusqu'à +16,9% pour le groupe avec l'augmentation de température la plus élevée (T4). Cette augmentation est corrélée à une augmentation du contenu lipidique dans les trois groupes MT (+2,5 à 3%, données non montrées), ce qui peut expliquer un taux de fonte plus élevé pour deux d'entre eux (Tableau 3). Ces résultats suggèrent donc qu'une modification de la température d'incubation pendant l'embryogenèse pourrait effectivement moduler le métabolisme énergétique chez le canard adulte,

ouvrant la voie à une nouvelle procédure simple et peu coûteuse pour la filière de production de foie gras.

## CONCLUSION

Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de mettre en évidence un impact de la modification de température lors de l'embryogenèse sur la physiologie des canards mulards, avec comme principal résultat une augmentation du poids de foie gras après gavage chez tous les groupes ayant subi une manipulation thermique embryonnaire. Ces résultats pourraient être très encourageants pour la filière et ouvrent désormais un nouveau champ d'étude afin de déterminer les mécanismes mis en jeu lors d'une manipulation thermique. Les conditions de programmation devront néanmoins être optimisées afin de limiter les impacts négatifs sur l'éclosabilité et le taux de fonte.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions l'ensemble des financeurs (CIFOG, Conseil départemental des Landes), et l'ensemble du personnel de l'Unité Expérimentale sur les Palmipèdes à Foie Gras qui a participé activement à ce travail.

**Tableau 3** : Composition corporelle à J15, avant (J83) et après (J95) gavage en fonction du traitement thermique

	T1 (contrôle)	T2 (+1°C, 24h/24h, E13 à E27)	T3 (+1°C, 16h/24h, E13 à E27)	T4 (+1,5°C, 16h/24h, E13 à E27)
<b>Dissection à J15 (n=28-31)</b>				
Poids de corps (n=122-151)	481,5 ± 50,4	495,2 ± 75,8	482,4 ± 55,5	506,9 ± 73,7
Poids du foie (g)	31,84 ± 6,79	31,22 ± 8,19	30,42 ± 5,89	34,64 ± 6,05
Poids du <i>pectoralis major</i> (g)	3,20 ± 0,70 <b>a</b>	3,73 ± 0,82 <b>b</b>	3,31 ± 0,92 <b>a</b>	3,75 ± 0,82 <b>b</b>
Poids du gras abdominal (g)	1,21 ± 0,76	1,16 ± 0,64	1,18 ± 0,96	1,22 ± 0,82
Poids de la cuisse (g)	29,93 ± 3,97	29,98 ± 5,24	30,25 ± 4,38	31,20 ± 4,91
<b>Dissection avant gavage (n=36-38)</b>				
Poids carcasses ressué	3541 ± 258 <b>a</b>	3715 ± 267 <b>b</b>	3592 ± 231 <b>a</b>	3653 ± 278 <b>a</b>
Poids du foie (g)	82,94 ± 12,15	83,61 ± 10,06	81,18 ± 10,42	85,03 ± 11,05
Poids du <i>pectoralis major</i> (g)	290,1 ± 27,6 <b>a</b>	306,8 ± 22,2 <b>b</b>	299,4 ± 25,7 <b>a</b>	297,1 ± 27,5 <b>a</b>
Poids du gras abdominal (g)	55,72 ± 23,88 <b>a</b>	72,86 ± 23,74 <b>b</b>	65,11 ± 23,59 <b>a</b>	69,83 ± 21,93 <b>b</b>
Poids de la cuisse (g)	343,8 ± 32,9	350,8 ± 35,5	341,7 ± 29,6	352,3 ± 33,2
<b>Dissection après gavage (n=47-52)</b>				
Poids carcasses ressué	5163 ± 329	5275 ± 325	5200 ± 281	5208 ± 433
Poids du foie (g)	449,1 ± 70,2 <b>a</b>	491,6 ± 96,9 <b>b</b>	494,8 ± 80,8 <b>b</b>	525,0 ± 96,2 <b>c</b>
Poids du <i>pectoralis major</i> (g)	300,1 ± 32,7	303,0 ± 35,2	303 ± 26,6	302,4 ± 31,5
Poids du gras abdominal (g)	173,6 ± 21,1 <b>a</b>	196,7 ± 33,9 <b>b</b>	189,2 ± 23,8 <b>b</b>	195,2 ± 30,0 <b>b</b>
Poids de la cuisse (g)	497,0 ± 43,4	495,4 ± 47,4	491,6 ± 41,5	491,6 ± 48,5
Taux de fonte (%)	24,23 ± 12,28 <b>a</b>	32,30 ± 12,28 <b>b</b>	28,87 ± 13,65 <b>a</b>	30,91 ± 13,04 <b>b</b>

a, b, c : sur une même ligne, les moyennes affectées d'au moins une lettre en commun ne diffèrent pas significativement ( $p < 0,05$ ), Moyenne ± écart-type

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Rukibat, R.K., Abu-Basha, E.A. 2017. Poultry Sci. 96, 234–240.
- Ashton, C., Stickland, N., 2005. Arch Tierz Dummerstorf 48, 04–10.
- Chartrin, P., M.J., Baéza, E., 2006. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 145, 413–418.
- Collin, A., Yahav, S., 2005. Anim. Res. 54, 105–111.
- Decuyper, E., Bruggeman, V., 2007. Poultry Sci. 86, 1037–1042.
- DuRant, S.E., Hepp, G.R., 2011. Physiol. Biochem. Zool. 84, 451–457.
- Fernandez, X., M.D., Manse, H., 2011. Poultry Sci. 90, 2360–2369.
- Guéméné, D., Faure, J.-M., 2006. Anim. Res. 55, 443–458.
- Hermier, D., Sellier, N., Rousselot-Paillet, D., Chapman, M.J., 1991. Lipids 26, 331–339.
- Li, X., Wang, J., 2017. J. Therm. Biol. 70, 37–45.
- Liu, H., Wang, J., 2015. J. Therm. Biol. 53, 80–89.
- Loyau, T., Collin, A., 2015. Animal 9, 76–85.
- Loyau, T., Yahav, S., 2013. J. Anim. Sci. 91, 3674–3685.
- Piestun, Y., Yahav, S., 2013. Poultry Sci. 92, 1155–1163.
- Piestun, Y., Yahav, S., 2011. J. Therm. Biol. 36, 469–474.
- Piestun, Y., Yahav, S., 2008a. Poultry Sci. 87, 1516–1525.
- Piestun, Y., Yahav, S., 2008b. J. Therm. Biol. 33, 413–418.
- Renaudeau, D., Collier, R.J., 2012. Animal 6, 707–728.
- Saadoun, A., Leclercq, B., 1987. J. Nutr. 117, 428–435.
- Terim Kapakin, K.A., Saglam, Y.S., 2013. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.
- Wang, G., Liu, H., 2014. J. Therm. Biol. 43, 40–45.
- Willemssen, H., Everaert, N., 2010. Poultry Sci. 89, 2678–2690.
- Yahav, S., Brake, J., 2014. J. Stem Cells 9, 17.
- Zaboli, G.-R., A., Mehri, M., 2017. Poultry Sci. 96, 478–485.
- Zuidhof, M.J., Robinson, F.E., 2014. Poultry Sci. 93, 2970–2982.

## Impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in ducks

William Massimino<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>2</sup>, Tracy Pioche<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>, Cécile Bonnefont<sup>3</sup>, Hélène Manse<sup>3</sup>, Mireille Morisson<sup>3</sup>, Anne Collin<sup>4</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>UEPFG INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco, F-40280 Benquet, France

<sup>3</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Castanet Tolosan, France

<sup>4</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

Email : [william.massimino@univ-pau.fr](mailto:william.massimino@univ-pau.fr)

### Summary

Thermal manipulation during embryogenesis has an immediate and long-term influence on physiology in birds. In this study, we aimed to test whether rising incubation temperature during the second half of embryogenesis, has an impact on the development, growth and adult phenotype in mule duck, the most popular bird used for fatty liver production.

The first observation was a decrease in incubation time in all treated groups compared to the control. Sexe ratio and hatching rates were not changed while body weight and temperature were significantly lower at hatching in all treated groups. At 15 day of age, the difference of body weight was totally caught up, while lower temperature was maintained all along the breeding.

Two weeks post hatching no differences were noticed on weights of liver, leg muscle, or adipose tissue, while breast muscle presented a small but significant increase in two treated groups compared to the control.

From day 45 to 59 post hatching, total body weight of the 3 treated groups has significantly exceeded the control group, leading to a strong negative correlation between body weight and temperature.

Finally, zootechnical results after overfeeding demonstrated a significant increase of liver weight in all treated groups.

These preliminary results suggest that embryonic thermal manipulation in mule ducks could accelerate growth and adult performance without alteration of hatchability or sexe ratio.

This innovative project could become an interesting and inexpensive strategy for fatty liver production.

**Keywords** : incubation temperature, physiology, fatty liver and meat production

## **Liver ontogeny in mule ducks: determination of the best embryonic thermal programming window**

**Massimino William**<sup>1</sup>, Davail Stéphane<sup>1</sup>, Pioche Tracy<sup>1</sup>, Ricaud Karine<sup>1</sup>, Gontier Karine<sup>1</sup>, Morisson Mireille<sup>2</sup>, Collin Anne<sup>3</sup>, Bernardet Marie-Dominique<sup>4</sup>, Panserat Stéphane<sup>1</sup>, Houssier Marianne<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NuMéA, INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Saint Pée sur Nivelles 64310, France

<sup>2</sup>GenPhySE, ENVT, INRA, Université de Toulouse, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

<sup>4</sup>UEPFG, INRA, Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco, 40280 Benquet, France

**Corresponding Author:** *marianne.houssier@univ-pau.fr*

Our team recently demonstrated that different rises in incubation temperature during the second half of embryogenesis, led to a better fattening of the liver after overfeeding in all treated groups (up to 15%) compared to control group. However, despite an increase in the yield of fatty liver, two distinct thermal manipulation conditions (with exactly the same cumulative rise in temperature) resulted in a decrease in hatchability and a slight deterioration in the quality of the final product. Based on these results we suggest that fatty liver production could be optimized by a more precise embryonic thermal manipulation, in particular by a better knowledge of the embryonic establishment of the different physiological functions of the liver. To this end, a kinetic study was designed to determine the level of expression of different genes involved in steatosis-related liver function throughout embryogenesis.

The livers of 20 embryos were collected every four days from the 12th day of embryogenesis until four days after hatching, and a Fluidigm real time PCR analysis was performed.

The complete results presented in a heat map led us to classify the 86 genes measured at 7 sampling points into 4 major pathways expressed differently all along embryogenesis.

First, most of mRNAs involved in lipid metabolism are overexpressed after hatching (FAS, SCD-1, ACLY and ACOX1). Interestingly, genes implicated in carbohydrate metabolism (HK1, InsR, GAPDH, ACSS1) and liver development (HGF, IGF and FGFR2) were predominantly overexpressed from E12 to E20 or E24. Finally, regarding cellular stress, the gene expression seems quite stable throughout development except for some mRNA which presented a peak of expression at hatching (IDH1, CYP2E1 and HSP90AA1).

Thermal manipulation applied on a large half of the embryogenesis (from E12 to E27) resulted in an increase in the production of fatty liver in mule ducks but also a reduction in the hatching or the quality of the final product. In this study, we highlighted for the first time the ontogeny of the liver in mule ducks, which may be useful for optimizing metabolic programming induced by thermal manipulation. Indeed, since the cumulative elevation threshold has already been determined, reducing the duration of thermal manipulation could allow different applications in order to improve the metabolic programming.

**Acknowledgements:** This work was supported by grants from the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras” (CIFO) and from “Comité Départemental des Landes” (CD40).

**Key words:** Ontogeny; Liver; Incubation; Genes

# Liver ontogeny in mule ducks: determination of the best embryonic thermal programming window

William Massimino<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>2</sup>, Tracy Pioche<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>, Mireille Morisson<sup>3</sup>, Anne Collin<sup>4</sup>, Stéphane Panserat<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>

## Purpose

Describe liver ontogeny at mRNA level in mule ducks to determine the best embryonic programming window

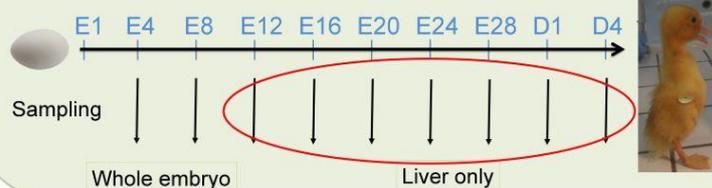
## Background

**Embryonic thermal manipulations** increased fatty liver production after overfeeding in mule ducks.

However, since **adverse effects** have also been observed in two programmed groups, we suggest that thermal programming could be optimized by a **better understanding of liver ontogeny**.

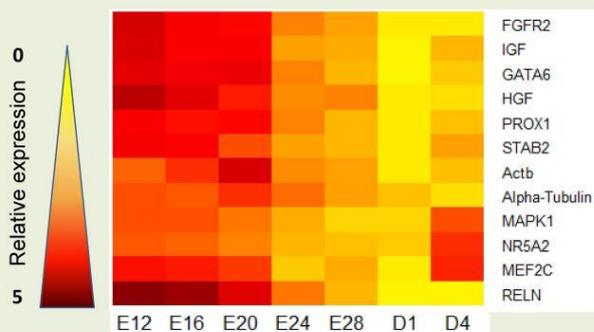
## Experiment

A **kinetic study** was designed to determine the level of expression of different genes involved in steatosis-related functions **throughout embryogenesis**



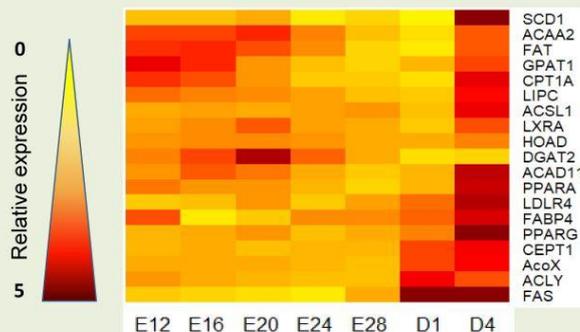
## Results

### Relative liver expression of developmental genes



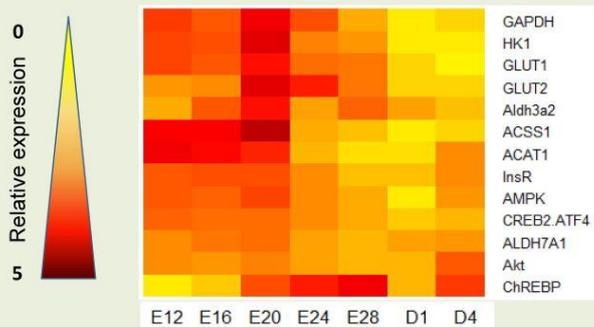
Most of genes predominantly arise at the beginning of the kinetic, the peak occurring between E12 and E20

### Relative liver expression of lipid-related genes



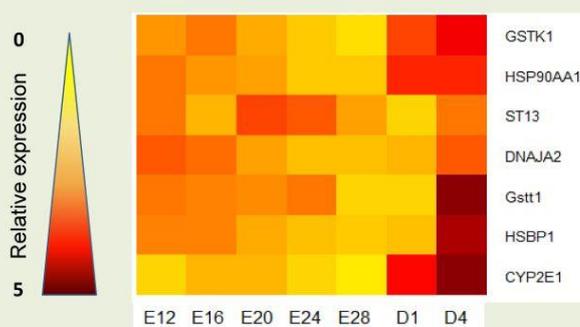
Strong increase in lipid-related genes at day 4, suggesting impact of first meals

### Relative liver expression of carbohydrate-related genes



Maximal expression occurs mainly at E20, with the exception of ChREBP which seems time-shifted

### Relative liver expression of stress-related genes



Strong increase at day 4, when the duckling are transferred to a breeding room (temperature change)

## Conclusion

Analysis of hepatic gene expression during mule duck embryogenesis suggests that our programming window could be reduced and narrowed around E20. This reduction in the period opens up new possibilities in the programming process to optimize fatty liver production.

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

<sup>2</sup>UEPFG INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco, F-40280 Benquet, France

<sup>3</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Castanet Tolosan, France

<sup>4</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

# IMPACT OF THERMAL MANIPULATION DURING EMBRYOGENESIS ON METABOLISM IN MULE DUCKS

## Doctoral Credits

## Linguistic courses

English course and Cambridge certificate

## Scientific courses

R Software

Introduction to scientific writing in English

Science festival

## Professional courses

Training in documentary research and scientific publication

Training in Research Ethics and Scientific Integrity

Teach instruction manual

The valorization of research: issues, bases and practices

Research Results and Intellectual Property

Cross-border doctoriales UPPA-UPV/EHU

Why and how to file a patent

Quality approach: A management and research project management tool

## Communication

Oral presentation in Dubrovnik for the European Poultry Conference in September 2018

## PhD Advisers

MARIANNE HOUSIER  
 STEPHANE DAVAIL

UMR NUMEA 1419  
 Quartier Ibarron  
 64310 Saint Pée sur Nivelle

IUT des Pays de l'Adour  
 371 Rue du Ruisseau  
 40000 Mont de Marsan



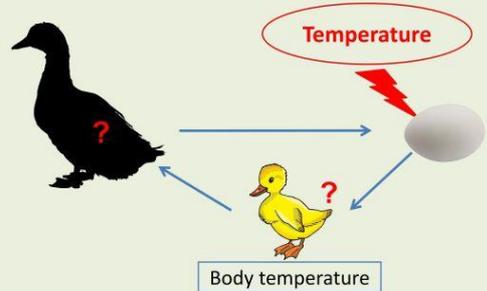
## Purpose

To determine if fatty liver and muscles production are increased by embryonic thermal manipulation in mule ducks

## Principle

### Developmental programming

It is based on early-life modifications induced during a 'sensitive' period by environmental stimuli (nutritional, temperature, hypoxia, etc.) that result in short or long-term modifications in metabolism

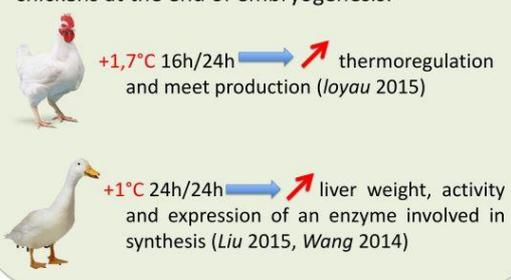


### Study of the impact of thermal treatment

- Liver weight
- Zootechnical analysis
- Gene expression
- Enzymatic activity
- Plasma measurement
- Histology

## Background

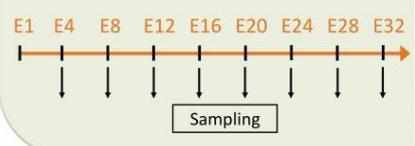
Thermal manipulation in Pekin ducks and chickens at the end of embryogenesis:



## 1) First experiment : Kinetic study

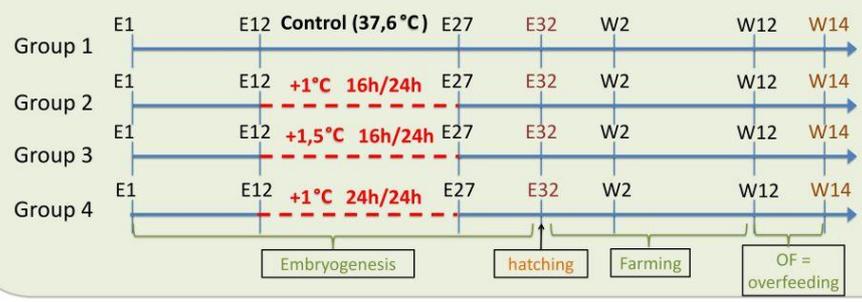
### Objective

Collect RNA samples at different embryonic stages in order to analyse the embryonic expression of a large panel of genes implicated in fatty liver production. This has never been done before.



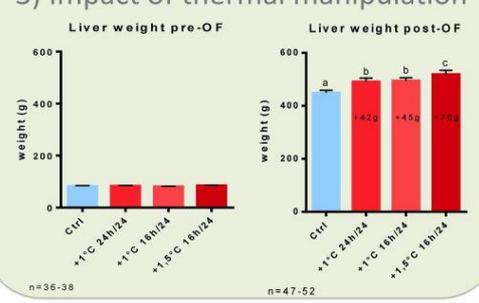
## 2) Second experiment : thermal manipulation

Four incubation conditions were tested

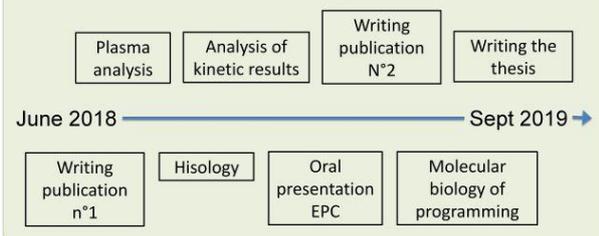


**Key**  
 E = Embryonic day  
 W = Week post hatching

## 3) Impact of thermal manipulation



## Goals and Objectives



**References:**  
 Liu, H. *et al.* Impact of thermal stress during incubation on gene expression in embryonic muscle of Peking ducks (*Anas platyrhynchos domestica*). *J. Therm. Biol.* **53**, 80–89 (2015).  
 Wang, G. *et al.* Influence of in ovo thermal manipulation on lipid metabolism in embryonic duck liver. *J. Therm. Biol.* **43**, 40–45 (2014).  
 Pietsun *et al.* Thermal manipulation during embryogenesis affects myoblast proliferation and skeletal muscle growth in meat-type chickens. *Poult. Sci.* (2015)

Ecole doctorale :

ED211

Laboratoire :

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