UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

INRAE, Unité Biologie des Oiseaux et Aviculture, Nouzilly

Equipe Métabolisme des Oiseaux, Qualité et Adaptation

THÈSE présentée par :

Angélique PETIT

Soutenue le : **13 Décembre 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Nutrition in ovo et mise en place de l'orientation métabolique chez les poulets de chair

THÈSE dirigée par :

Mme TESSERAUD Sophie	Directrice de Recherche, INRAE, Nouzilly
Mme METAYER-COUSTARD Sonia	Chargée de Recherche, INRAE, Nouzilly

RAPPORTEURS :

M. POLAKOF Sergio	Directeur de Recherche, INRAE, Clermont-Ferrand
Mme LIAUBET Laurence	Chargée de Recherche, INRAE, Toulouse

JURY :

M. ROGER Sébastien	Professeur, Université de Tours(Président du jury)
M. POLAKOF Sergio	Directeur de Recherche, INRAE, Clermont-Ferrand
Mme TESSERAUD Sophie	Directrice de Recherche, INRAE, Nouzilly
Mme LIAUBET Laurence	Chargée de Recherche, INRAE, Toulouse
Mme RIVAL-GERVIER Sylvie	Chargée de Recherche, INSERM, Lyon
Mme METAYER-COUSTARD Sonia	Chargée de Recherche, INRAE, Nouzilly

N'attendez pas d'être sûr de vous pour agir.

Agissez pour devenir sûr de vous…

John C. Maxwell

Remerciements

En 2020, après deux ans d'attente pour obtenir un financement, me voici propulsée dans cette belle aventure qu'est le doctorat. Les maîtres mots de cette formation par la recherche sont : ouverture d'esprit, autonomie, communication, expertise et persévérance. L'acquisition de ces compétences, savoir être ainsi que la réalisation de mon projet de thèse ont été possible grâce à des personnes qui m'ont accompagnée et soutenue au cours de ces trois années.

Tout d'abord, je tiens à dire un très grand merci à ma directrice de thèse **Sophie TESSERAUD** pour sa gentillesse, sa capacité à se rendre disponible dans toutes les circonstances, son implication dans le projet et sa facilité à transmettre et partager ses connaissances scientifiques. Nos randonnées en Ardèche aux aurores resteront mon plus beau souvenir.

Je souhaite ensuite remercier mon encadrante qui est devenue ma seconde directrice de thèse au cours de ma troisième année : **Sonia Métayer-Coustard**. Son côté rassurant et cocasse, notamment lors des congrès et formations, m'auront permis de m'épanouir pleinement.

Je suis très reconnaissante envers **Laurence Liaubet** et **Sergio Polakof** qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse et envers **Sylvie Rival-Gervier** et **Sébastien Roger** qui ont accepté d'être examinateurs de ce travail de recherche, concrétisation de plusieurs années d'échanges, de remises en question, d'expérimentations et d'acquisition de connaissances. Sylvie Rival-Gervier, ce fût un véritable plaisir de vous avoir rencontré et d'avoir pu participer aux prélèvements dans le cadre du projet COMODES. Sébastien Roger, merci de m'avoir accompagné lors des journées Biotechnocentre et de m'avoir appris à jouer au tarot.

Stéphane Panserat, **Marianne Houssier**, **Joelle Dupont**, je vous suis reconnaissante pour votre aide et vos précieux conseils lors des comités de thèse.

Merci aux différentes équipes de l'unité BOA et notamment à **Cécile Berri** et **Elisabeth Le Bihan-Duval** de m'avoir accueillie tout au long de ses trois années. Je souhaite exprimer toute ma gratitude à l'équipe MOQA (**Philippe Bochereau**, **Claire Bonnefous**, **Elisabeth Baéza**, **Anne Collin**, **Pascal Chartrin**, **Laurence Guilloteau**, **Christophe Praud**, **Thierry Bordeau**, **Estelle Cailleau-Audouin**, **Nathalie Couroussé**, **Estelle Godet**, **Sabine Crochet**, **Noé Palmic**, **Pierre Blavy**) qui a toujours répondu présente pour que je puisse réaliser mon projet de thèse dans les meilleures conditions. Mention particulière aux personnes qui se sont avérées être bon public lors de mes "blagues" farfelues comme celle du four encastré dans le sol après avoir cassé le carrelage de la cuisine ou encore celle du poussin.

Justine Jimenez, **Philippe Bochereau**, **Maeva Halgrain** vous resterez mes plus belles rencontres. Merci pour votre aide, votre soutien et tous les bons moments que nous avons partagé ensemble. Philippe Bochereau, je te lègue enfin mon grand bureau. J'espère que ton esprit se sentira plus aéré pour finir au mieux ta dernière année de thèse.

Je voudrais également remercier **Lydie Nadal-Desbarats** et **Antoine Lefevre** pour leur accueil au sein de la plateforme de métabolomique de l'Université de Tours. Votre gentillesse et votre sens de la pédagogie m'ont permis de découvrir avec intérêt la spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans les animaliers du pôle d'expérimentation avicole de Tours (**UE-PEAT**) qui ont pris soin des œufs embryonnés et poussins, donc un grand merci à vous.

Mes derniers mots seront pour ma famille qui a supporté mes récits à n'en plus finir pendant trois ans voire plus sans jamais y comprendre quelque chose.

Résumé

Améliorer la robustesse des animaux vise à promouvoir leurs capacités d'adaptation à des ressources alimentaires variées et au changement climatique, tout en préservant leurs capacités de reproduction, leur santé et leur bien-être. Mon travail de thèse avait pour principal objectif de mieux comprendre l'impact des nutriments disponibles dans l'œuf et de la sélection génétique sur la mise en place précoce de l'orientation métabolique. Mes travaux de recherche ont été réalisés sur un modèle unique de deux lignées divergentes pour le pH ultime de la viande (pHu+ et pHu-). Ce critère de sélection est fortement corrélé aux réserves en glycogène musculaire (r^2 = -0,97) qui peuvent impacter la qualité des produits, les performances des animaux et leur robustesse depuis l'éclosion jusqu'à l'âge d'abattage.

La caractérisation fine du vitellus, du liquide amniotique et du liquide allantoïque d'œufs embryonnés par des approches de biochimie et/ou de métabolomique (spectroscopie RMN du proton) a permis d'obtenir une vision d'ensemble sur l'environnement nutritionnel des embryons pHu et d'évaluer leur métabolisme de manière indirecte. Des différences de composition ont été observées dans le vitellus (teneurs en lipides, formate, lactate, leucine, etc.) et le liquide amniotique (acides aminés ramifiés, glucose, choline, formate, etc.) des lignées pHu+ et pHu- avant la mise en incubation des œufs (E0) puis au 10ème jour du développement embryonnaire (E10). Les profils métaboliques obtenus pour le liquide allantoïque aux jours 10, 14 et 17 du développement embryonnaire (E10, E14, E17) ont permis d'une part, d'identifier des métabolites discriminants entre les deux lignées et d'autre part, de mettre en évidence des signatures métaboliques précoces propres à chaque lignée dès E10.

Afin de déterminer l'impact des nutriments (*in ovo* et post-éclosion) sur le métabolisme des lignées pHu et de définir la fenêtre durant laquelle l'orientation métabolique se met en place, nous avons étudié l'ontogenèse du métabolisme protéino-énergétique dans le foie (carrefour du métabolisme) et le muscle *Pectoralis major* (tissu cible de la sélection). Pour atteindre ces objectifs, nous avons établi une cinétique avec des mesures d'expression à différents stades du développement embryonnaire (E12, E14, E18) et post-éclosion (J0, J8). Ces stades ont été choisis en fonction des sources de nutriments disponibles, des étapes clés du développement, de la physiologie et de la vitesse de croissance des embryons.

Grâce aux heatmaps et au regroupement hiérarchique des gènes, nous avons identifié différents profils d'expression permettant de visualiser l'évolution des fonctions et voies métaboliques

ciblées. Au vu des niveaux d'expression obtenus pour le foie et le muscle, plusieurs voies métaboliques sont ralenties en fin d'incubation (E18) lorsque le taux de croissance des embryons diminue et les sources de nutriments s'appauvrissent. Concernant les lignées, de nombreux gènes étaient différentiellement exprimés dans le foie dès le 12ème jour du développement embryonnaire (E12), bien que ce dernier ne soit pas le tissu cible de la sélection. Une hétérogénéité plus importante a été observée chez la lignée pHu+ pour laquelle deux sous-groupes ont été mis en évidence dans le foie au moment de l'éclosion. D'après l'étude des paramètres pondéraux et sériques tels que le poids du foie, l'activité créatine kinase ou encore les teneurs en triglycérides, le processus d'éclosion (très énergivore) a plus d'impact sur les pHu+ qui ont moins de réserves en glycogène musculaire que sur les pHu-. Pour le muscle, les différences entre lignées se manifestent principalement à 8 jours d'âge, sous l'effet des apports exogènes de nutriments.

En conclusion, l'ensemble des données obtenues au cours de la thèse nous procure des premiers éléments pour élaborer des stratégies nutritionnelles précoces visant à orienter le métabolisme du poussin pour améliorer sa qualité et sa robustesse, et favoriser son développement ultérieur.

Résumé en anglais

Improving the robustness of animals aims to promote their ability to adapt to diversified food resources and climate change, while preserving their reproductive capacities, health and welfare. My PhD work aimed to better understand the impact of nutrients available in the egg and of genetic selection on the early establishment of metabolic orientation. My research work was carried out on a unique model of two divergent lines for the ultimate pH of meat (pHu+ and pHu-). This selection criterion is strongly correlated with muscle glycogen reserves (r^2 = -0.97), which can have an impact on product quality, animal performance and robustness from hatching to slaughter age.

Detailed characterization of the yolk, amniotic fluid and allantoic fluid from embryonated eggs, using biochemical and/or metabolomic approaches (proton NMR spectroscopy), allowed an overview of the nutritional environment of pHu embryos, and an indirect assessment of their metabolism. Compositional differences were observed in the yolk (lipid, formate, lactate, leucine, contents) and amniotic fluid (branched amino acids, glucose, choline, formate, etc.) of the pHu+ and pHu- lines before egg incubation (E0) and again on the 10th day of embryonic development (E10). The metabolic profiles obtained for allantoic fluid on days 10, 14 and 17 of embryonic development (E10, E14, E17) enabled us to identify discriminating metabolites between the two lines and to highlight early metabolic signatures specific to each line from as early as E10.

In order to determine the impact of nutrients (*in ovo* and post-hatching) on the metabolism of pHu lines and to define the window during which metabolic orientation is established, we studied the ontogeny of protein-energy metabolism in the liver (metabolism crossroads) and the *Pectoralis major* muscle (target tissue for selection). To achieve these objectives, we established kinetics with expression measurements at different stages of embryonic development (E12, E14, E18) and post-hatching (D0, D8). These stages were chosen according to available nutrient sources, key developmental stages, physiology and growth rate of the embryos.

Thanks to heatmaps and hierarchical gene clustering, we identified different expression profiles to visualize the evolution of targeted functions and metabolic pathways. In view of the expression levels obtained for liver and muscle, several metabolic pathways are slowed down at the end of incubation (E18) when embryo growth rate decreases and nutrient sources are

depleted. About the lines, many genes were differentially expressed from the 12th day of embryonic development (E12), although the liver was not the target tissue of selection. Greater heterogeneity was observed in the pHu+ line, for which two subgroups were identified in the liver at hatching. According to weight and serum parameters such as liver weight, creatine kinase activity and triglyceride levels, the energy-intensive hatching process has a greater impact on pHu+, which have fewer muscle glycogen reserves than pHu-. For muscle, differences between lines appear mainly at 8 days of age, under the effect of exogenous nutrient supplies.

In conclusion, all the data obtained during the thesis give us the basis to develop early nutritional strategies aimed at orienting the chick's metabolism to improve its quality and robustness, and favor its later development.

Table des matières

Remerciements 5

Résumé 7

Résumé en anglais 9

Table des matières 11

Liste des figures 15

Liste des tableaux 19

Liste des abréviations 21

Liste des publications 23

Introduction générale 27

Etude bibliographique 33

I. L'embryon et son environnement 35

A. Compartiments de l'œuf 35

B. Mise en place et rôle des annexes embryonnaires 37

C. Evolution des sources de nutriments au cours de l'incubation 41

II. Métabolisme de l'embryon et du jeune poussin 45

A. Cycle de Krebs 45

B. Métabolisme lipidique 45

1. Synthèse d'acides gras de novo 45

2. Catabolisme des lipides à des fins énergétiques 47

3. Peroxydation des lipides et statut antioxydant 49

C. Métabolisme protéique 49

1. Synthèse protéique 49

2. Protéolyse ou catabolisme protéique 51

3. Evolution du métabolisme protéique au cours du développement embryonnaire et post-éclosion 55

4. Spécificités chez les oiseaux 56
D. Métabolisme glucidique 57
1. Glycémie et insulinémie 57
2. Importance des glucides pendant l'embryogenèse 58
3. Transport du glucose dans le foie et les muscles squelettiques 58
4. Néoglucogenèse et glycolyse 59
5. Glycogénèse et glycogénolyse 61
E. Principaux régulateurs du métabolisme 61
III. Influence de la nutrition précoce sur l'orientation métabolique et la programmation des phénotypes 65
Objectifs, présentation du modèle animal et démarche expérimentale 81
I. Enjeux 83
II. Objectif 83
III. Présentation du modèle 83
A. Effets de la sélection sur les caractéristiques biochimiques et histologiques du muscle *Pectoralis major* à J42 83
B. Effets de la sélection sur le métabolisme des animaux à J42 85
C. Effets de la sélection sur le métabolisme des poussins 87
D. Effets de la sélection sur la croissance et la consommation alimentaire des poussins 89
E. Effets de la sélection sur la qualité des poussins 89
IV. Démarche expérimentale 91
A. Caractérisation des principales sources de nutriments *in ovo* chez les lignées pHu+ et pHu- 91
B. Caractérisation du liquide allantoïque 92
C. Caractérisation du métabolisme hépatique et musculaire au cours du développement pré- et post-éclosion 92
V. Valorisation des résultats 93

Travaux personnels 95

Chapitre 1 : Les nutriments disponibles dans l'œuf et leur utilisation par l'embryon sont-ils comparables entre les lignées pHu+ et pHu- au cours de l'incubation ? 97

Chapitre 2 : Peut-on mettre en évidence des signatures métaboliques spécifiques dans le liquide allantoïque des œufs pHu+ et pHu- ? 115

Chapitre 3 : Comment les métabolismes hépatique et musculaire évoluent-ils au cours du développement pré- et post-éclosion et quelles sont les différences entres les lignées pHu+ et pHu- ? 133

I. Le foie 134

II. Le muscle 179

III. Approches complémentaires (muscle) 195

Discussion générale 201

Conclusion et perspectives 215

Références 219

Annexes 237

Liste des figures

Figure 1 : Evolution de la production mondiale de viandes sur la période 2010-2023 et perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO, à l'horizon 2029. 29
Figure 2 : Formation de l'œuf lors de son transit dans l'oviducte de la poule. 35
Figure 3 : Représentation des compartiments de l'œuf et de leur composition avant la mise en incubation (E0).. 36
Figure 4 : Fonctions de la coquille et des structures extra-embryonnaires au 11ème jour du développement embryonnaire (E11) chez le poulet.. 38
Figure 5 : Réseau vasculaire extra-embryonnaire permettant à l'embryon de poulet d'utiliser les nutriments du vitellus (entre 50 et 56 heures d'incubation). 39
Figure 6 : Schéma illustrant le pédicule vitellin qui relie l'intestin de l'embryon au sac vitellin, au 6ème jour d'incubation (Wong et Uni, 2021). 39
Figure 7 : Evènements majeurs et sources de nutriments disponibles au cours du développement embryonnaire (E0 à E21). 40
Figure 8 : Evolution de la production de chaleur (mW/œuf) entre le 7ème et 18ème jour d'incubation chez les poulets de chair Cobb 500 et Ross 308 (Nangsuay et al., 2017). 42
Figure 9 : Le cycle de Krebs, une voie de convergence des voies cataboliques et le point de départ de certaines voies de biosynthèse. 44
Figure 10 : Principaux changements dans le métabolisme hépatique au cours du développement embryonnaire (**A**) et néonatal (**B**) des poulets (Surugihalli et al., 2019). 46
Figure 11 : Schéma général du métabolisme protéique. 48
Figure 12 : Représentation du concept d'acide aminé limitant avec la lysine. 50
Figure 13 : Représentation des différentes voies de l'autophagie (Panserat et al., 2019). 52
Figure 14 : Différentes étapes de la macroautophagie : principale forme d'autophagie dans les cellules. 52
Figure 15 : Evolution avec l'âge du taux de synthèse des protéines corporelles (Ks en %/j) chez le poulet (Muramatsu et al., 1987). 54
Figure 16 : Acteurs moléculaires impliqués dans la synthèse et la dégradation du glycogène.. 60
Figure 17 : Principales voies contrôlant le métabolisme ainsi que les fonctions hépatiques et musculaires. 62

Figure 18 : Impact de l'environnement et de la génétique sur l'établissement des phénotypes.. 64
Figure 19 : Evolution du pH ultime, mesuré dans le muscle *Pectoralis major* des lignées pHu+ et pHu-, au cours des générations de sélection. 84
Figure 20 : Modifications métaboliques liées à la sélection sur le pHu (Beauclercq et al., 2016). 84
Figure 21 : Caractérisation du métabolisme protéino-énergétique dans le muscle du poussin à l'éclosion. 86
Figure 22 : Evolution du gain moyen quotidien (g/jour) et de la consommation journalière d'aliments (g) entre le 5ème jour post-éclosion et l'âge d'abattage chez les lignées pHu+ et pHu- (Berger et al., 2022). 88
Figure 23 : Critères de qualité du poussin (Tona et al., 2003). 90
Figure 24 : Activités métaboliques du foie. 132
Figure 25 : Régulation de la voie de signalisation mTOR par les acides aminés branchés tels que la leucine, l'isoleucine et la valine (Kim et al., 2022). 181
Figure 26 : Evolution de l'expression des gènes d'intérêt, mesurée dans le muscle *Pectoralis major* des pHu-, au cours du développement embryonnaire (E12, E14, E18) et post-éclosion (J0 et J8). 186
Figure 27 : Représentation des 8 clusters identifiés chez les pHu- entre E12 et J8. 187
Figure 28 : Evolution de l'expression des gènes d'intérêt, mesurée dans le muscle *Pectoralis major* des pHu+, au cours du développement embryonnaire (E12, E14, E18) et post-éclosion (J0 et J8). 188
Figure 29 : Représentation des 6 clusters identifiés chez les pHu+ entre E12 et J8. 189
Figure 30 : Mesure du ratio MyoD/MYF5 permettant d'évaluer la capacité des cellules musculaires à proliférer ou s'engager dans la différenciation selon le stade de développement. 192
Figure 31 : Evolution du potentiel glycolytique musculaire durant la période pré- et post-éclosion des lignées pHu+ et pHu-. 197
Figure 32 : (**A**) Quantification et (**B**) mesure de l'activité de la glycogène phosphorylase dans le muscle *Pectoralis major* des lignées pHu+ et pHu- à J5, en tenant compte du statut alimentaire des animaux (à jeun vs renourris 1 heure). 198
Figure 33 : Schéma intégrant les principaux résultats de la thèse et les perspectives. 203
Figure 34 : Illustration des principaux changements métaboliques dans le foie au cours du développement embryonnaire (E12, E14, E18) et post-éclosion (J0, J8) des lignées pHu. 206

Figure 35 : Répartition du pourcentage d'embryons développés (vert), peu développés (jaune) et non développés (orange) entre 53 et 76 heures d'incubation, chez les lignées pHu+ (N = 146) et pHu- (N = 140). 208
Figure 36 : L'axe intestin-foie dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire chez les animaux (Ringseis et al., 2020). 212
Figure 37 : Représentation des principales conclusions et perspectives de l'étude. 217

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des acides aminés essentiels et non essentiels chez les volailles (Wu, 2009). 50

Tableau 2 : Evolution des paramètres pondéraux au cours du développement pré- et post-éclosion des lignées pHu+ et pHu-. 180

Tableau 3 : Liste des gènes différentiellement exprimés entre les lignées pHu+ et pHu- durant le développement pré- et post-éclosion (E12 à J8)..... 190

Tableau 4 : Liste des gènes différentiellement exprimés entre les mâles et les femelles pHu à l'éclosion. 192

Liste des abréviations

Acétyl-CoA : Acétyl-coenzyme A

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Adénosine monophosphate

ARNm : Acide ribonucléique messager

ATG : Gènes liés à l'autophagie

ATP : Adénosine triphosphate

CAM : Membrane chorioallantoïque

DIOs : Désiodases

E1 : Enzyme activatrice de l'ubiquitine

E2 : Enzyme conjuguant l'ubiquitine

E3 : Ubiquitine ligase

FABPs : Protéines de transport des acides gras

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FATPs : Protéines de liaison aux acides gras

FBP : Fructose-1,6-bisphosphatase

Fru-6-P : Fructose 6-phosphate

G1P : Glucose-1-phosphate

G3P : Glycéraldéhyde 3-phosphate

G6PC : Glucose-6-phosphatase

GLUTs : Transporteurs de glucose

GPx : Glutathion peroxydase

HK : Hexokinase

IR : Récepteur à l'insuline

IRS-1 : Principal substrat du récepteur de l'insuline

ITAVI : Institut technique de l'aviculture, pisciculture et cuniculture

KOH : Hydroxyde de potassium

LDH : Lactate déshydrogénase

Mt : Millions de tonnes

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OPLS-DA : Analyse Discriminante par projections orthogonales des moindres carrés partiels

PC : Pyruvate carboxylase

PCA : Acide perchlorique

PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PFK : Phosphofructokinase

PG : Potentiel glycolytique

PGM1 : Phosphoglucomutase 1

PHK : Phosphorylase kinase

pHu : pH ultime

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PK : Pyruvate kinase

PP1 : Protéine phosphatase 1

Q^2 : Qualité de la prédiction

qPCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel

R^2Y : Séparation des classes

RMN ^1H : Résonnance magnétique nucléaire du proton

RMN ^1P : Résonnance magnétique nucléaire du phosphore

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

rT3 : Triiodothyronine inverse

SBRI : Institut cellule souche et cerveau

SGLTs : Co-transporteurs sodium/glucose

SPIDES : Courtes périodes d'incubation pendant le stockage des œufs

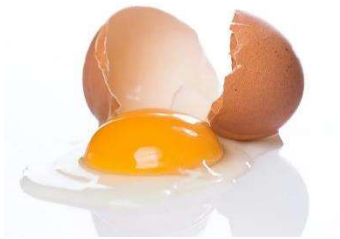
T2 : Diiodothyronine

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

VLDL : Lipoprotéines de très faible densité

Liste des publications







Articles originaux

- ✓ **Petit A**, Tesseraud S, Collin A, Courousse N, Berri C, Le Bihan-Duval E, Métayer-Coustard S. Ontogeny of hepatic metabolism in broiler lines divergently selected on the ultimate pH of *Pectoralis major*. Soumis à *BMC Genomics* en Octobre 2023.

- ✓ **Petit A**, Tesseraud S, Beauclercq S, Nadal-Desbarats L, Cailleau-Audouin E, Réhault-Godbert S, Berri C, Le Bihan-Duval E, Métayer-Coustard S. Allantoic fluid metabolome reveals specific metabolic signatures in chicken lines different for their muscle glycogen content. Sci Rep. 2023;13(1):8867.

- ✓ Erensoy K, Raynaud E, **Petit A**, Baumard Y, Métayer-Coustard S, Le Bihan-Duval E. Research Note: Divergent selection for breast muscle ultimate pH affects egg quality traits in broiler breeders. Poult Sci. 2022;101(11):102142.

- ✓ Beauclercq S, Mignon-Grasteau S, **Petit A**, Berger Q, Lefèvre A, Métayer-Coustard S, Tesseraud S, Emond P, Berri C, Le Bihan-Duval E. A Divergent Selection on Breast Meat Ultimate pH, a Key Factor for Chicken Meat Quality, is Associated With Different Circulating Lipid Profiles. Front Physiol. 2022;13:935868.

- ✓ **Petit A**, Réhault-Godbert S, Nadal-Desbarats L, Cailleau-Audouin E, Chartrin P, Raynaud E, Jimenez J, Tesseraud S, Berri C, Le Bihan-Duval E, Métayer-Coustard S. Nutrient sources differ in the fertilised eggs of two divergent broiler lines selected for meat ultimate pH. Sci Rep. 2022;12(1):5533.

Revues de synthèse

- ✓ Coustham V, Andrieux C, Cerutti C, David I, Demars J, Devailly G, Morisson M, Houssier M, Lagarrigue S, Métayer-Coustard S, Mignon-Grasteau S, Panserat S, **Petit A**, Vitorino Carvalho A, Zerjal T, Pitel F. Epigénétique, gènes et environnement : quelle importance pour les pratiques d'élevage et les méthodes de sélection des volailles ? Accepté dans INRAE Productions Animales en 2023.

- ✓ Andrieux C*, **Petit A***, Collin A, Houssier M, Métayer-Coustard S, Panserat S, Pitel F, Coustham V. Early phenotype programming in birds by temperature and nutrition: A mini-review. Front Anim Sci. 2022;2.
  *Co-premier auteur

- ✓ Métayer-Coustard S, **Petit A**, Quentin M, Tesseraud S. Nouvelles stratégies alimentaires précoces au service de la production avicole. INRAE Prod Anim. 2019;32(3):417-430.

Communications orales à des congrès

- ✓ **Angélique Petit**, Sophie Tesseraud, Thierry Bordeau, Estelle Cailleau-Audouin, Estelle Godet, Maria Palomar-Lloris et al. Early carbohydrate metabolism in chicken lines divergently selected on ultimate pH, a proxy for muscle glycogen reserves. 7th EAAP International Symposium on Energy and Protein metabolism and nutrition (ISEP), Septembre 2022, Grenade, Espagne.

- ✓ Vincent Coustham, Charlotte Andrieux, Anne Collin, Ingrid David, Julie Demars, Marianne Houssier, Sandrine Lagarrigue, Sonia Métayer-Coustard, Sandrine Mignon-Grasteau, **Angélique Petit**, Anaïs Vitorino Carvalho, Tatiana Zerjal, Frédérique Pitel. L'épigénétique à l'interface entre l'environnement et l'ADN : Quelle importance pour les pratiques d'élevage et les méthodes de sélection ? 14èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Mars 2022, Tours, France.

- ✓ **Angélique Petit**, Sophie Réhault-Godbert, Lydie Nadal-Desbarats, Estelle Audouin, Pascal Chartrin, et al. Metabolomic analysis of nutrient sources in the embryonic egg of two divergent lines for meat ultimate pH. Incubation and Fertility Research Group (IFRG), Août 2019, Tours, France.

Pitchs

- ✓ **Angélique Petit**. Nutrition *in ovo* et mise en place précoce de l'orientation métabolique chez les poulets de chair. Journée Natural Concept, Novembre 2022, Rennes, France. Prix 2022 « Durabilité des élevages ».

- ✓ **Angélique Petit**, Sophie Tesseraud, Lydie Nadal-Desbarats, Estelle Cailleau-Audouin, Cécile Berri, et al. Nutrition précoce et orientation métabolique d'embryons de poulets divergents pour leurs réserves énergétiques musculaires. 34ème Colloque Biotechnocentre, Octobre 2022, Nouan-le-Fuzelier, France.

Posters

- ✓ **Angélique Petit**, Sophie Tesseraud, Lydie Nadal-Desbarats, Estelle Cailleau-Audouin, Cécile Berri, et al. Nutrition précoce et orientation métabolique d'embryons de poulets divergents pour leurs réserves énergétiques musculaires. 34ème Colloque Biotechnocentre, Octobre 2022, Nouan-le-Fuzelier, France. Prix de la meilleure affiche.

- ✓ **Angélique Petit**, Lydie Nadal-Desbarats, Frédéric Montigny, Estelle Cailleau-Audouin, Pascal Chartrin, Sophie Réhault-Godbert et al. Projet « INOVE » - Crédit incitatif 2017 : Recherche d'indicateurs *in ovo* du statut énergétique de l'animal. Journées d'Animation Scientifique du Département Phase, Mai 2022, Poitiers, France.

- ✓ Lydie Nadal-Desbarats, **Angélique Petit**, Sophie Réhault-Godbert, Cécile Martias, Frédéric Montigny, Elisabeth Le Bihan-Duval, Sonia Metayer-Coustard. Etude par spectroscopie 1H-NMR du profil métabolique du liquide allantoïque au cours du développement embryonnaire de deux lignées de poulets divergentes pHu- et pHu+. 12èmes Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), Mai 2019, Clermont-Ferrand, France.

Introduction générale

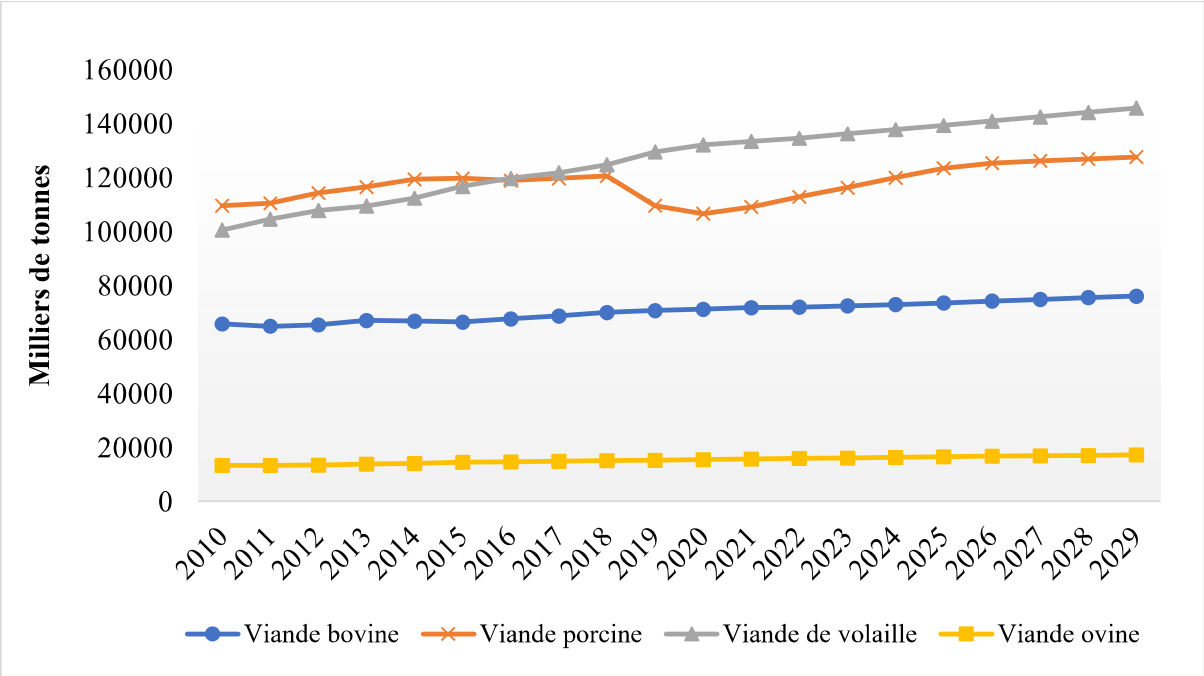


Figure 1 : Evolution de la production mondiale de viandes sur la période 2010-2023 et perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO, à l'horizon 2029.

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques ; FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

Les volailles sont des espèces aviaires domestiquées qui peuvent être élevées pour leurs œufs, leur viande et/ou leurs plumes. Le terme « volaille » couvre un large éventail d'oiseaux allant des poules aux faisans, en passant par les canards, les dindons, les pintades, les oies, les cailles, les pigeons et les autruches. Depuis les années 2000, le taux de croissance annuel moyen de la production mondiale de viande de volaille est de 3,3% contre 1,4% pour la viande porcine, 1,5% pour la viande ovine et 0,90% pour la viande bovine. En 2017, la volaille devient la première viande produite dans le monde avec 118 millions de tonnes (Mt) (**Fig. 1**).

La croissance du secteur des volailles est principalement portée par la production du poulet qui représente 89% de la production mondiale en 2020. L'engouement des consommateurs pour le poulet est lié à une viande bon marché, pauvre en matières grasses et qui ne fait l'objet de presque aucune restriction religieuse ou culturelle (Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2021-2030, Éditions OCDE, Paris). La production de dinde (5%) et de canard (4%) restent plus modestes, même si elles suivent également une dynamique de croissance sur les dix dernières années. En 2020, la Chine devient le premier producteur mondial de volailles avec 26,4 Mt, devançant les Etats-Unis (23,1 Mt), suivis de l'Union européenne (15,8 Mt) et du Brésil (13,7 Mt). D'après la situation du marché des volailles de chair, édité en mars 2021 par l'Institut Technique de l'Aviculture, Pisciculture et Cuniculture (ITAVI), les poulets standards représentent 67% des abattages en France contre 25% pour les poulets respectant un cahier des charges Label Rouge (15%), Certifiés (8%) ou Bio (2%). Pour répondre à une demande croissante, les poulets de chair ont été sélectionnés génétiquement sur leur vitesse de croissance, leur efficacité alimentaire et leur rendement en viande. En France, ils sont abattus entre 35 et 42 jours ce qui signifie que la période d'incubation (21 jours) représente plus de 33% de la durée de vie totale des lignées commerciales à croissance rapide (Givisiez et al., 2020).

La phase de démarrage, cruciale pour le devenir des animaux, est particulièrement délicate à gérer ce qui renforce l'importance de la qualité initiale du poussin. Chez les poulets de chair à croissance rapide, la qualité du poussin est un enjeu important, d'autant plus que la durée d'élevage est réduite (Métayer-Coustard et al., 2022). Après l'éclosion, les poussins sont immatures d'un point de vue immunitaire et digestif (Karpala et al., 2012 ; Alkie et al., 2019 ; Rubio, 2019), et n'ont pas la capacité de réguler efficacement leur température corporelle (Dunnington et Siegel, 1984). Ainsi, les fluctuations de température, le transport des poussins, l'accès retardé à l'eau et l'alimentation post-éclosion peuvent compliquer le démarrage des poussins avec des risques de dysfonctionnement du système immunitaire, une probabilité

accrue d'infections bactériennes, une prise de poids corporelle insuffisante et des taux de mortalité élevés.

La capacité du poussin à exprimer son potentiel de croissance dès l'éclosion dépend des nutriments disponibles dans l'œuf au cours du développement embryonnaire et de son statut énergétique. De faibles réserves en glycogène ont été associées à des éclosions plus tardives, une diminution du poids des poussins et une altération des performances ultérieures (rendement en muscle, qualité de la viande, performances de reproduction, etc.) (Uni et al., 2005 ; Tasharofi et al., 2018 ; Zhao et al., 2017 ; Zhao et al., 2018). Après une étude bibliographique sur l'environnement *in ovo* des embryons, leur métabolisme et l'influence de la nutrition précoce sur l'orientation métabolique et la programmation des phénotypes, les objectifs et la démarche expérimentale de la thèse seront détaillés. Les résultats des différentes expériences seront présentés sous forme d'articles scientifiques précédés d'un résumé synthétisant le ou les objectifs de chaque expérience, les résultats majeurs et les principales conclusions. Les résultats complémentaires obtenus pour le muscle *Pectoralis major* seront décrits à la suite du troisième article. Dans la dernière partie de ce mémoire, je discuterai des résultats et présenterai les perspectives de ce travail.

Etude bibliographique

I. L'embryon et son environnement

L'œuf est une enceinte close qui assure la protection de l'embryon et qui contient tous les nutriments essentiels à son développment.

A. Compartiments de l'œuf

L'**albumen**, plus communément appelé « blanc d'œuf », est une structure aqueuse principalement composée d'eau et de protéines qui sont synthétisées et sécrétées par le magnum dans l'oviducte des poules reproductrices (**Fig. 2**). La sécrétion d'eau et de minéraux (sodium, potassium, etc.) se poursuit également dans les parties distales de l'oviducte. Chez les oiseaux, le développement de l'oviducte et la synthèse des protéines de l'albumen sont fortement dépendants des hormones stéroïdiennes telles que les oestrogènes, la progestérone, la testostérone et les glucocorticoïdes.

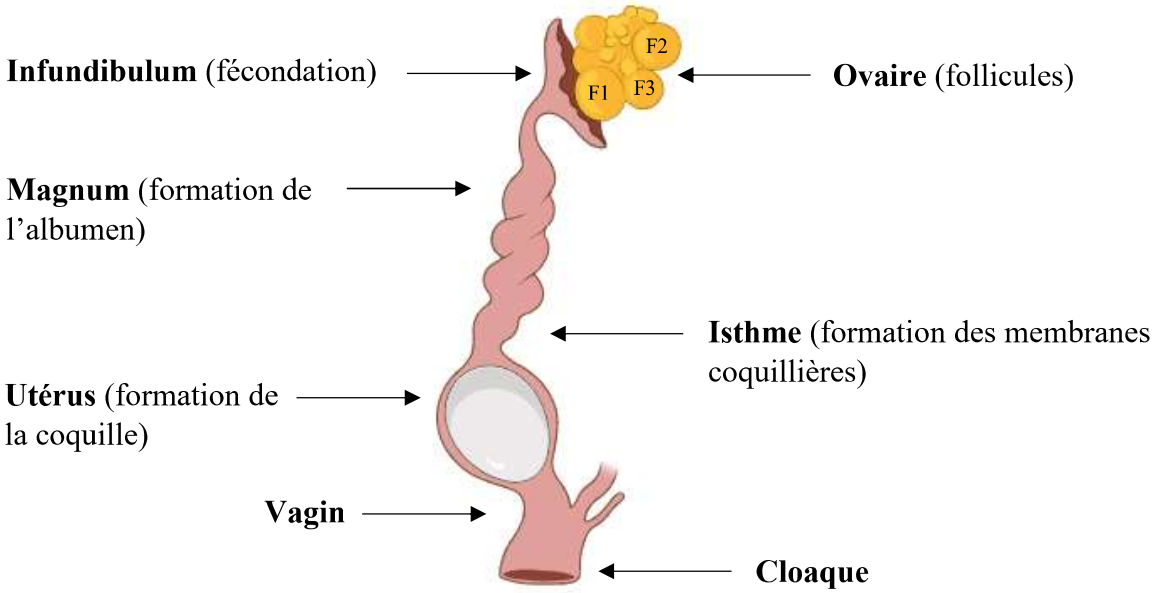
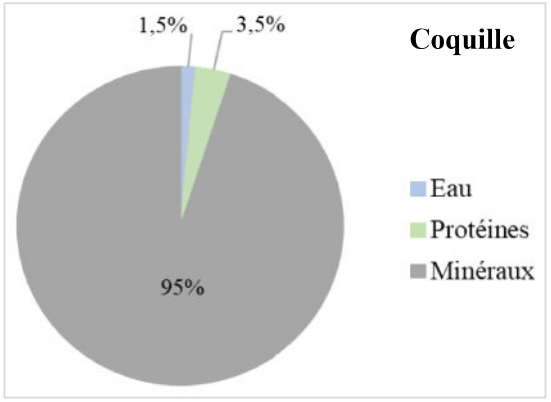
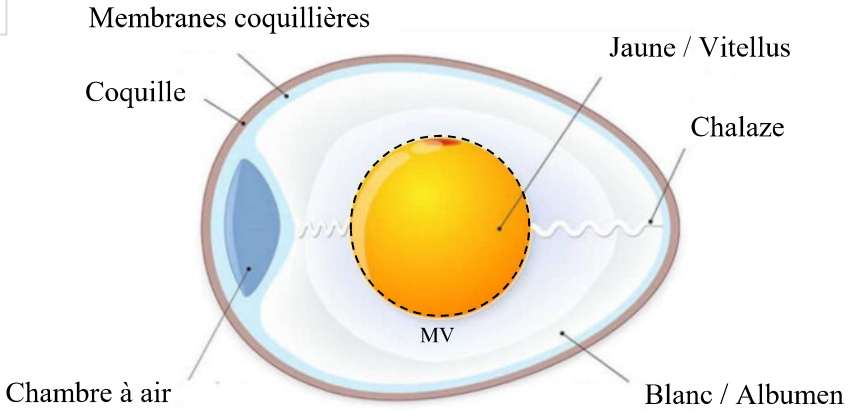
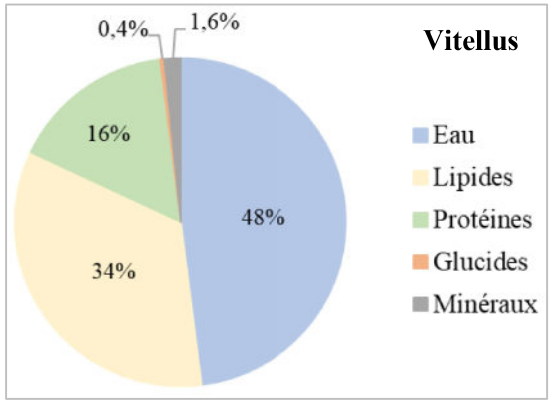


Figure 2 : Formation de l'œuf lors de son transit dans l'oviducte de la poule.

Les propriétés physicochimiques de l'albumen (pH et viscosité) et sa forte teneur en protéines antimicrobiennes (ovotransferrine, ovomucine, lysozyme, ovomucoïde…) sont extrêmement importantes pour la défense de l'embryon.







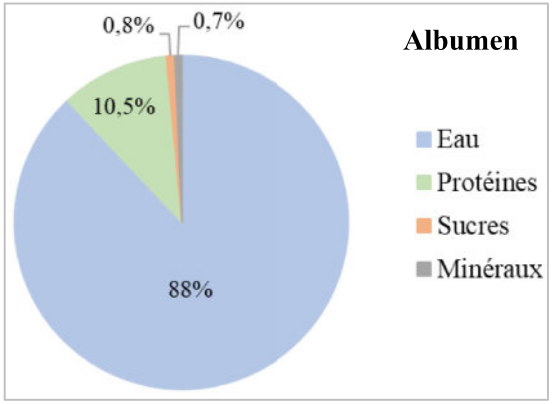


Figure 3 : Représentation des compartiments de l'œuf et de leur composition avant la mise en incubation (E0). MV = Membrane vitelline.

La nature gélatineuse et l'environnement alcalin de l'albumen (pH > 7) sont défavorables à la croissance et la motilité des bactéries (Réhault-Godbert et al., 2011 ; Guyot et al., 2016). Un stockage prolongé est généralement associé à une augmentation du pH, à une survie bactérienne plus élevée, une dénaturation des protéines et une perte de leur activité biologique (Rehault-Godbert et al., 2010 ; Obianwuna et al., 2022).

Le **vitellus** ou « jaune d'œuf » est composé d'environ 48% d'eau, 16% de protéines, 34% de lipides et moins de 1% de glucides (**Fig. 3**). A l'exception des immunoglobulines maternelles, les composants du vitellus sont en grande partie synthétisés dans le foie des poules reproductrices puis transportés vers l'ovaire sous forme de vitéllogénine et de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) (Noble et Cocchi, 1990). Bien que les teneurs en macronutriments (protéines, lipides, glucides) soient relativement stables, sa composition en acides gras, caroténoïdes, vitamines et minéraux peut varier en fonction de la génétique, du poids de l'œuf, de l'âge et du régime alimentaire des poules reproductrices.

Les **membranes coquillières** forment une barrière physique semi-perméable entre la coquille et l'albumen, ce qui permet les échanges de gaz et d'eau tout en limitant la pénétration des bactéries.

La **membrane vitelline**, apparentée à la zone pellucide chez les mammifères, limite la diffusion des nutriments du vitellus vers l'albumen et constitue l'ultime barrière physique empêchant les microbes d'accéder au jaune d'œuf (Waclawek et al., 1998 ; Mann, 2008).

B. Mise en place et rôle des annexes embryonnaires

Chez les poulets de chair, la période d'incubation est de 21 jours. Une fois l'œuf fécondé, l'embryon commence à se développer au niveau du **blastodisque,** disque germinatif de couleur blanche situé à la surface du vitellus. Le développement des structures extra-embryonnaires se fait principalement pendant la première moitié du développement (Romanoff, 1967), une fois les œufs mis en incubation à 37,8°C avec une hydrométrie entre 50 et 55%. Chez les espèces ovipares, les sacs vitellin, amniotique et allantoïque permettent de maintenir les fonctions vitales de l'embryon (respiration, digestion, etc.) jusqu'à ce que les organes deviennent fonctionnels (**Fig. 4**).

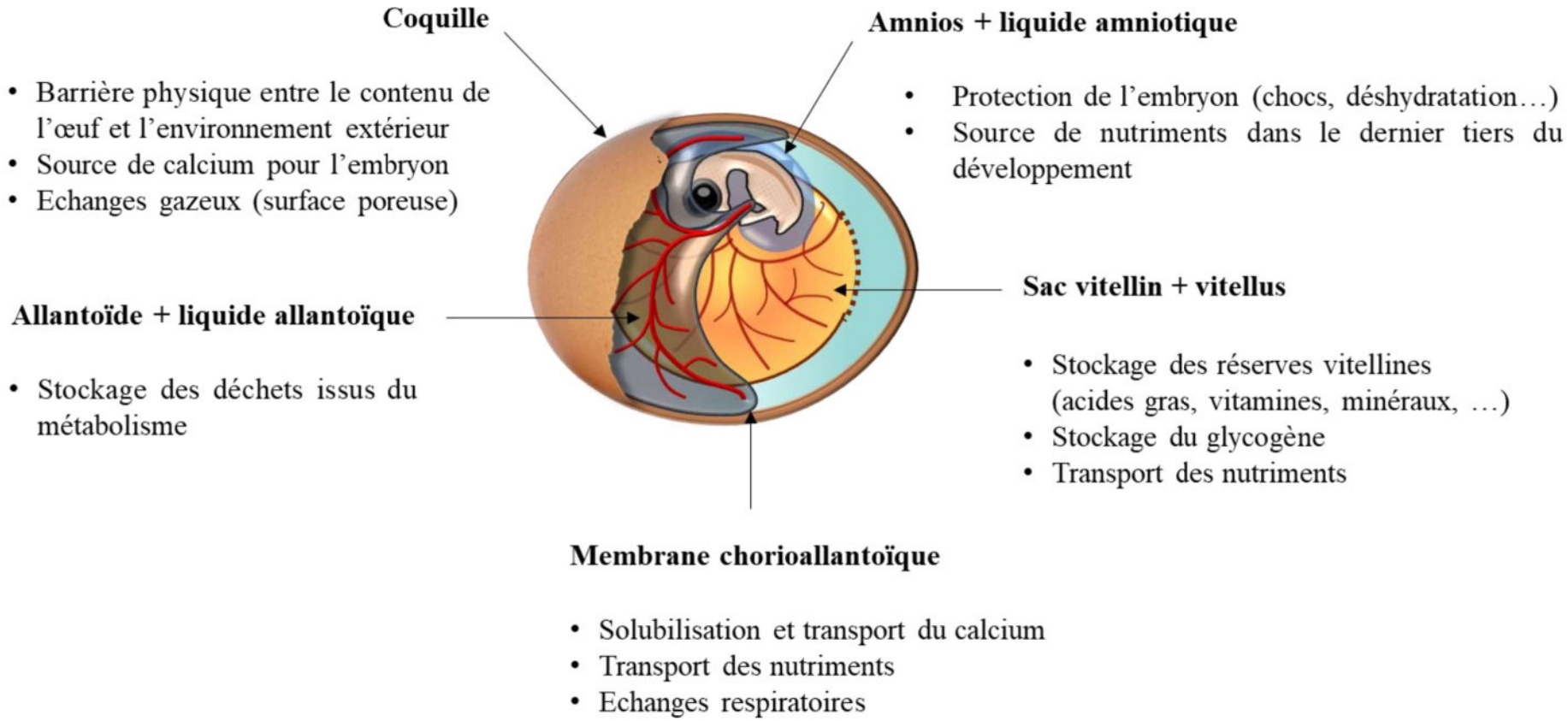


Figure 4 : Fonctions de la coquille et des structures extra-embryonnaires au 11ème jour du développement embryonnaire (E11) chez le poulet. Illustration adaptée de Da Silva et al., 2019.

Selon le stade d'incubation, les nutriments du vitellus sont transférés à l'embryon à travers la membrane du sac vitellin hautement vascularisée (**Fig. 5**) ou par le pédicule vitellin (**Fig. 6**) (Van der Wagt et al., 2020).

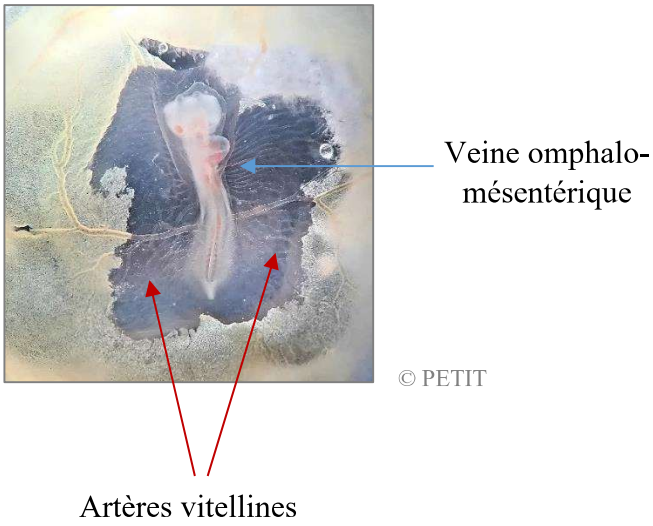


Figure 5 : Réseau vasculaire extra-embryonnaire permettant à l'embryon de poulet d'utiliser les nutriments du vitellus (entre 50 et 56 heures d'incubation). D'après les stades de Hamburger et Hamilton (1951).

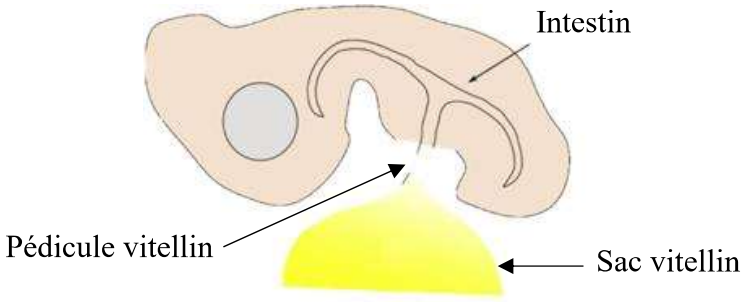


Figure 6 : Schéma illustrant le pédicule vitellin qui relie l'intestin de l'embryon au sac vitellin, au 6ème jour d'incubation (Wong et Uni, 2021).

La **membrane du sac vitellin** est un tissu multifonctionnel capable d'absorber les nutriments tel un intestin, de stocker du glycogène, de transporter les anticorps maternels vers la circulation embryonnaire et de produire des globules rouges (Wong et Uni, 2021). Sa surface et son poids atteignent un pic à E15 puis diminuent à l'approche de l'éclosion (Yadgary et al., 2013).

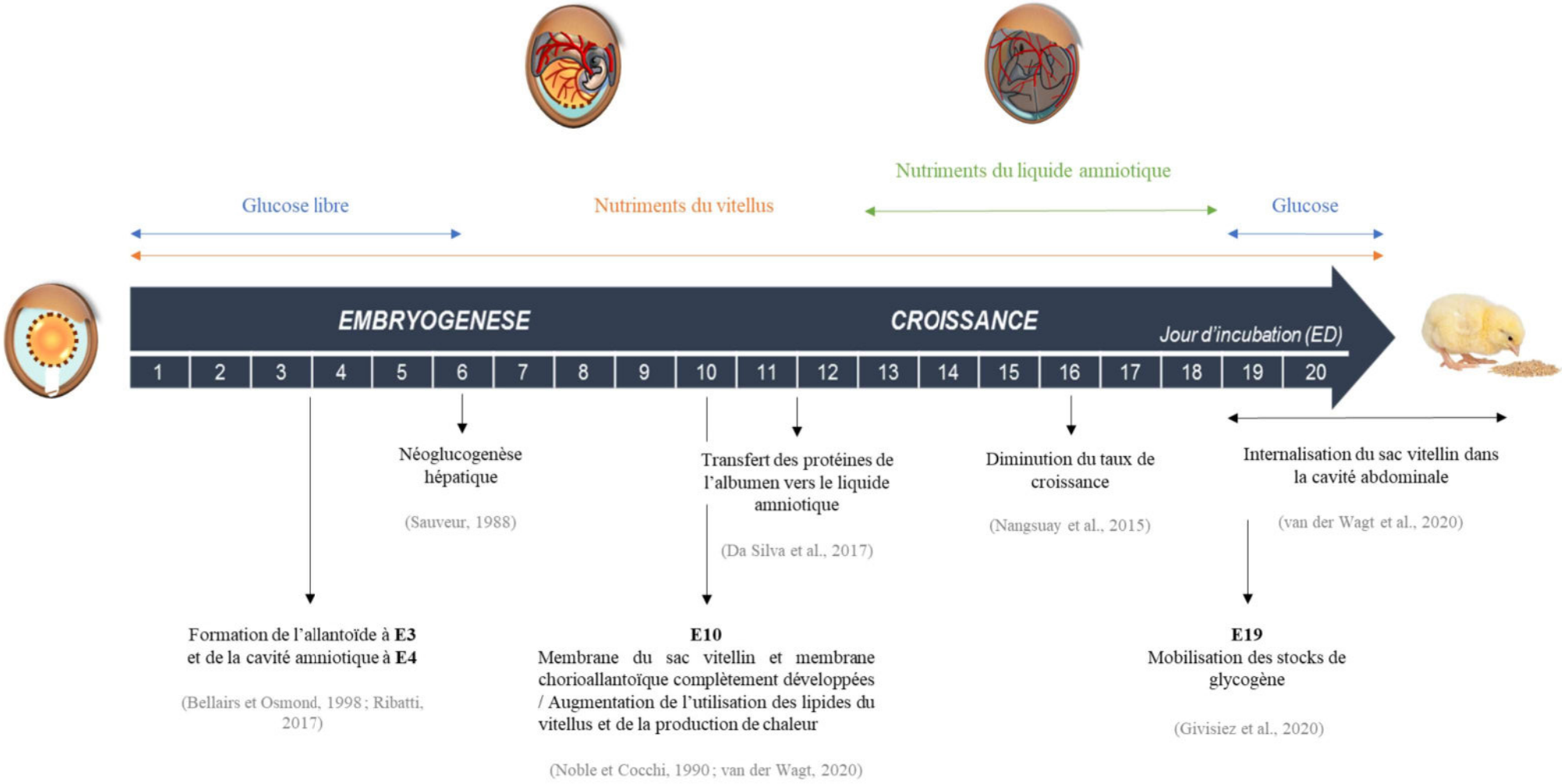


Figure 7 : Evènements majeurs et sources de nutriments disponibles au cours du développement embryonnaire (E0 à E21).

La formation de l'**amnios**, membrane qui entoure l'embryon au cours du développement *in ovo*, débute après 30 à 33 heures d'incubation. Il renferme le liquide amniotique et protège l'embryon contre la dessication, les chocs externes, les fluctuations de température et de pH. Au 11ème jour du développement embryonnaire, la plupart des fonctions attribuées aux protéines du liquide amniotique chez le poulet (morphogenèse, métabolisme et transport des lipides, vitamines et hormones, réponse immunitaire et homéostasie) sont similaires à celles observées chez l'Homme (Da Silva et al., 2019).

L'**allantoïde**, diverticule endodermique de l'intestin postérieur, est la dernière annexe extra-embryonnaire à apparaitre. Elle se forme à 60 heures d'incubation en arrière du pédicule vitellin. Entre le 5ème et 6ème jour du développement (E5-E6), l'allantoïde commence à fusionner avec le chorion pour former la membrane chorioallantoïque (CAM) qui se différencie complètement à E12. Cette dernière est reliée à l'embryon par un système circulatoire continu et se retrouve en contact étroit avec la coquille. L'allantoïde et la CAM permettent les échanges gazeux via les pores de la coquille, le transport du calcium pour l'ossification des os et le stockage des déchets issus du métabolisme de l'embryon (Ribatti, 2016 ; Da Silva et al., 2017 ; Ahmed et al., 2022).

C. Evolution des sources de nutriments au cours de l'incubation

Durant les premiers stades du développement, l'énergie nécessaire à la morphogenèse est fournie par le glucose (**Fig. 7**). L'oxygène nécessaire au métabolisme aérobie du glucose est fourni par diffusion. Après avoir utilisé le glucose libre, l'embryon synthétise ses propres glucides à partir des acides aminés du vitellus. Cette néoglucogenèse est effectuée par le foie dès que celui-ci commence à se différencier (E6).

Au cours du développement, 94% des besoins énergétiques de l'embryon proviennent de l'oxydation des acides gras (Sahan et al., 2014). D'après Noble et Cocchi (1990), l'utilisation des lipides présents dans le vitellus augmente considérablement à partir de E13. En effet, jusqu'au 11ème jour d'incubation, la membrane du sac vitellin et à la CAM ne sont pas suffisamment développées pour transporter de manière optimale les nutriments du sac vitellin vers la circulation embryonnaire et fournir assez d'oxygène pour l'oxydation complète des acides gras (Moran, 2007).

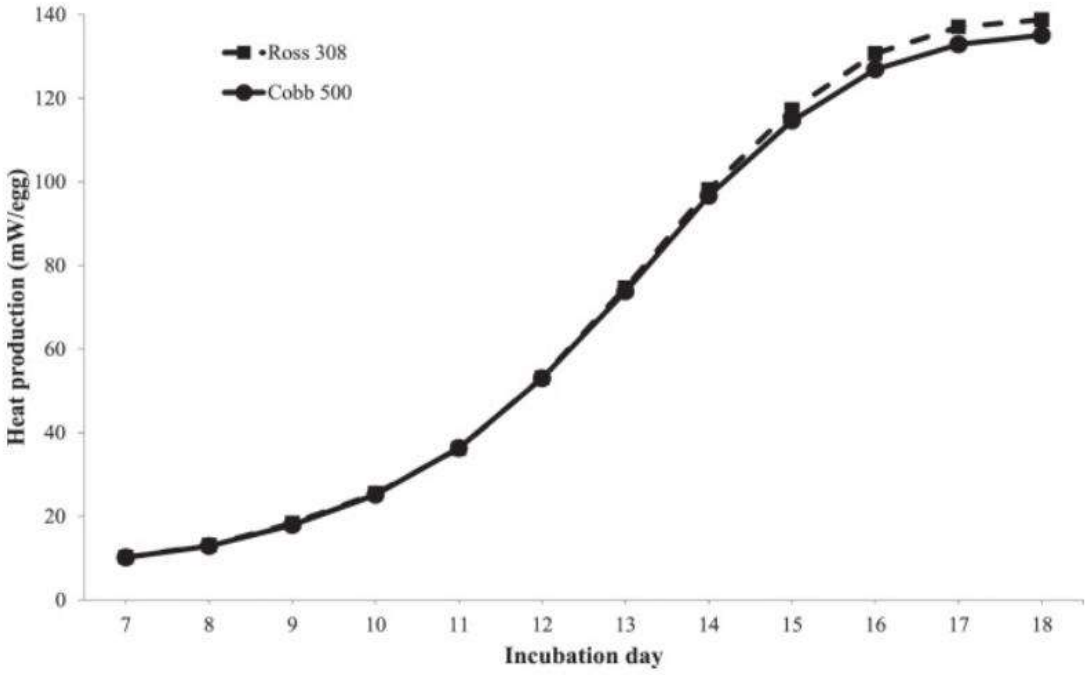


Figure 8 : Evolution de la production de chaleur (mW/œuf) entre le 7ème et 18ème jour d'incubation chez les poulets de chair Cobb 500 et Ross 308 (Nangsuay et al., 2017).

Suite à l'ouverture de la connexion séro-amniotique et de l'afflux massif des protéines de l'albumen, la composition protéique du liquide amniotique change de manière importante en milieu de développement (Da Silva et al., 2019). A E11, c'est-à-dire juste avant le transfert, 91 protéines ont été identifiées dans le liquide amniotique de poulet. Les fonctions attribuées aux protéines les plus abondantes (apolipoprotéine A1, ovotransferrine, alpha foetoprotéine, protéine liant la vitamine D, etc.) sont le métabolisme et le transport des lipides, des vitamines et des hormones, l'homéostasie et la réponse immunitaire. A partir de E12, le liquide amniotique acquiert un potentiel antibactérien accru. La consommation orale du liquide amniotique commence vers E17, ce qui favorise la croissance de l'embryon, le développement rapide de la muqueuse intestinale ainsi que les dépôts de glycogène dans le foie et le muscle (Da Silva et al., 2019 ; Givisiez et al., 2020).

La dernière semaine d'incubation est le siège de nombreux changements physiologiques et métaboliques (absorption du liquide amniotique, augmentation des réserves en glycogène, internalisation du sac vitellin dans la cavité abdominale de l'embryon, initiation de la respiration pulmonaire, etc.) pouvant affecter de manière significative la survie de l'embryon et les performances ultérieures de l'animal (De Oliveira et al., 2008). En raison d'un taux métabolique élevé, les besoins en énergie et en oxygène de l'embryon augmentent. Cependant, entre E15 et E19, les échanges gazeux sont limités, la production de chaleur atteint un plateau (**Fig. 8**) et l'utilisation des acides gras est insuffisante pour répondre aux besoins énergétiques de l'embryon (Haron et al., 2017 ; Maatjens et al., 2017 ; Nangsuay et al., 2017 ; Givisiez et al., 2020). Les teneurs en glucose étant relativement faibles dans l'œuf, la néoglucogenèse hépatique est donc essentielle pour produire du glucose et assurer un stockage suffisant de glycogène au cours de l'incubation (Moran, 2007). A l'approche de l'éclosion, l'embryon dépendra davantage de l'énergie issue de la glycolyse anaérobie et du glucose stocké sous forme de glycogène dans le foie, les muscles et la membrane du sac vitellin. Lorsque les réserves de glycogène sont limitées, voire épuisées, d'autres substrats comme les acides aminés glucoformateurs ou encore le glycérol peuvent être utilisés pour produire de l'énergie, au détriment parfois du développement corporel et du statut énergétique (Molenaar et al., 2013). Le bêchage des membranes coquillières et de la coquille est permis grâce à l'activité du muscle pipping (*Muscularis complexus*) situé à l'arrière de la tête du poussin.

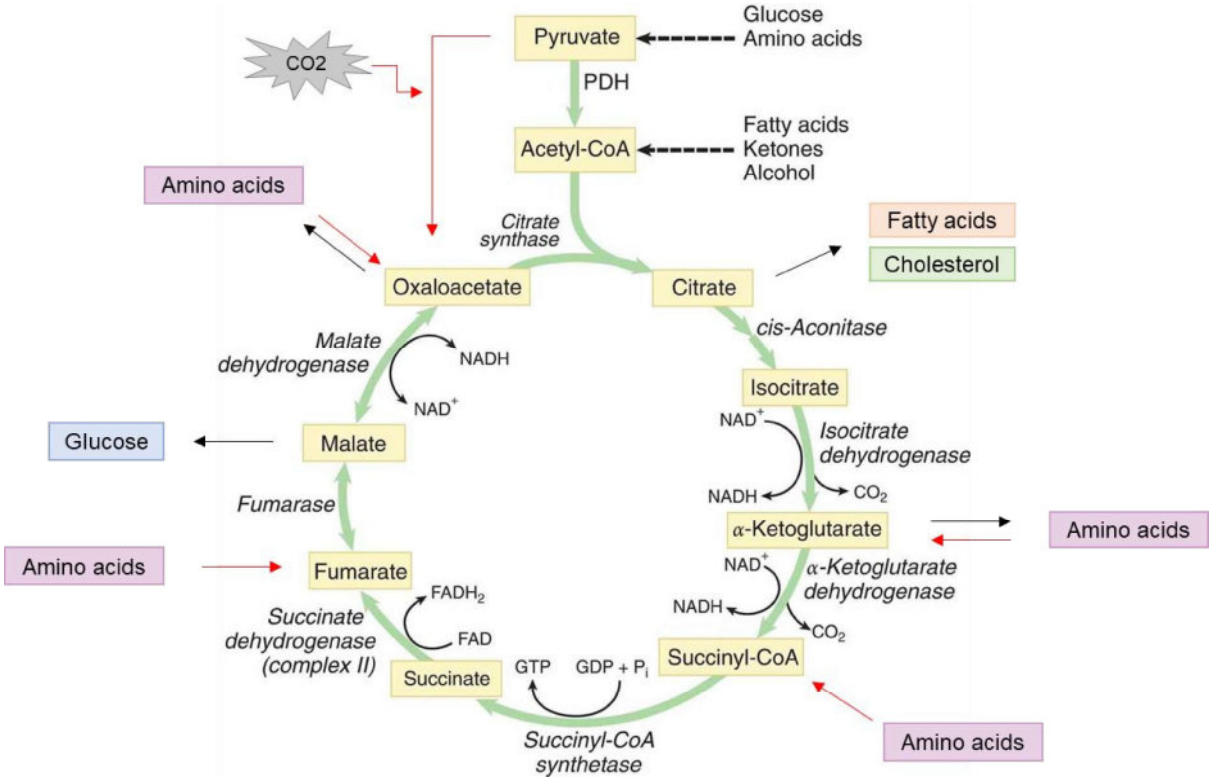


Figure 9 : Le cycle de Krebs, une voie de convergence des voies cataboliques et le point de départ de certaines voies de biosynthèse.

Les flèches noires correspondent aux voies de biosynthèse tandis que les flèches rouges correspondent aux réactions anaplérotiques qui permettent la formation des intermédiaires du cycle de Krebs.

II. Métabolisme de l'embryon et du jeune poussin

Les flux métaboliques doivent être adaptés aux besoins physiologiques. Cette adaptation se fait au niveau cellulaire, tissulaire ainsi qu'au niveau de l'organisme entier et passe par une régulation précise et coordonnée des voies métaboliques.

A. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, également appelé cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de l'acide citrique est une voie de dégradation oxydative qui se déroule dans la matrice mitochondriale des cellules eucaryotes. L'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) est une molécule à haut potentiel d'hydrolyse située au carrefour de plusieurs voies métaboliques importantes telles que la β-oxydation des acides gras, la glycolyse et la dégradation des protéines (**Fig. 9**). Lorsque l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs, il se lie à l'oxaloacétate pour former le citrate. Les différentes réactions biochimiques qui se produisent ensuite ont pour but de produire des intermédiaires énergétiques qui permettront la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) dans la chaîne respiratoire.

Parmi les voies de biosynthèse qui utilisent les intermédiaires du cycle de Krebs, on retrouve :

- La voie de biosynthèse des lipides avec les acides gras et le cholestérol
- Les voies de biosynthèse de certains acides aminés tels que le glutamate ou l'aspartate
- La voie de biosynthèse des porphyrines

B. Métabolisme lipidique

1. Synthèse d'acides gras de novo

Chez les espèces aviaires, le foie est le principal site de la lipogenèse *de novo*. Le glucose est dégradé en acétyl-CoA, qui est ensuite converti en acides gras et en cholestérol. Dans le foie, le cholestérol et les triglycérides sont incorporés dans les VLDL pour être transportés vers d'autres tissus, via la circulation (Wang et al., 2017). Les premiers jours post-éclosion constituent une période critique chez les poulets de chair. Le poussin doit augmenter son activité métabolique pour assurer une thermorégulation optimale.

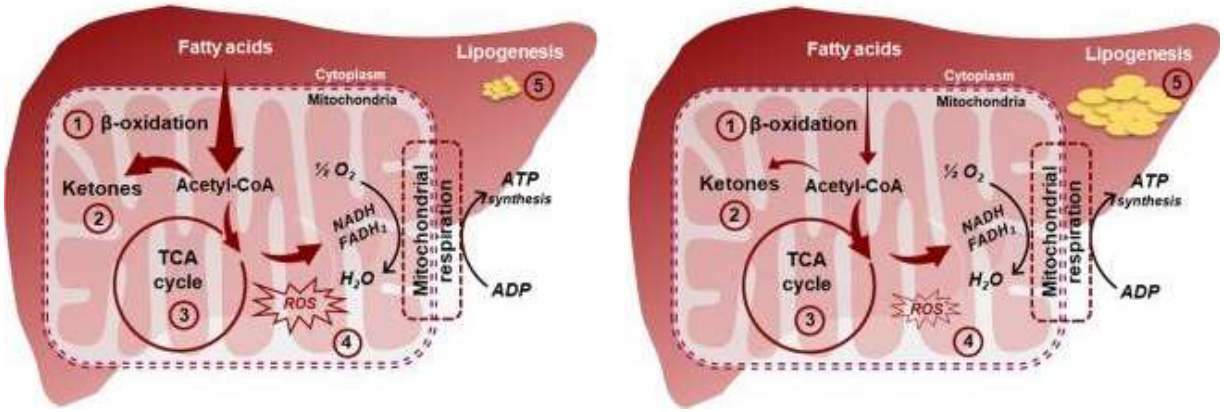


Figure 10 : Principaux changements dans le métabolisme hépatique au cours du développement embryonnaire (**A**) et néonatal (**B**) des poulets (Surugihalli et al., 2019).

La taille des flèches indique l'importance des processus tels que la β-oxydation, la formation de corps cétoniques, la production d'espèces réactives de l'oxygène ou encore de la lipogenèse lors de ces deux périodes.

Plusieurs facteurs de transcription ainsi que leurs coactivateurs/co-inhibiteurs semblent exercer des actions opposées sur le métabolisme des lipides, conduisant à la prédominance de la lipolyse chez l'embryon et de la lipogenèse chez le poussin nouvellement éclos (Cogburn et al., 2018 ; Surugihalli et al., 2019) (**Fig. 10**). Ce saut métabolique est rendu possible par l'axe thyroïdien et l'action des désiodases (DIOs). La DIO3, qui catalyse l'inactivation des hormones thyroïdiennes, est fortement exprimée dans le foie des embryons mais son expression diminue à l'approche de l'éclosion. La thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3) sont respectivement transformées en triiodothyronine inverse (rT3) et diiodothyronine (T2). Ce processus évite une exposition prématurée des tissus embryonnaires à des concentrations élevées en hormones thyroïdiennes. A l'inverse, la DIO1 et DIO2 catalysent l'activation des hormones thyroïdiennes. Bien que la DIO1 soit relativement constante pendant la période péri-éclosion, la DIO2 atteint un pic d'expression à E20 (Cogburn et al., 2018). La pro-hormone T4 est convertie en T3 métaboliquement active, ce qui favorise la thermorégulation et l'activation synergique de THRSPA (Thyroid Hormone Responsive Spot 14 Alpha), régulateur clé de la lipogenèse hépatique chez le poulet (Cogburn et al., 2020). Chez les poussins nouvellement éclos, le premier repas induit une forte augmentation de l'expression des gènes lipogéniques et contribue à l'accumulation de lipides. Ces résultats ont permis de mettre en évidence une programmation transcriptionnelle de la lipogenèse hépatique lors du passage d'une alimentation riche en lipides à une alimentation riche en glucides et protéines.

2. *Catabolisme des lipides à des fins énergétiques*

Les voies métaboliques impliquées dans le catabolisme des lipides sont la β-oxydation, la lipolyse et par extension, la cétogenèse. La lipolyse correspond à la dégradation des triglycérides en acides gras et glycérol. Elle se produit dans les adipocytes (action d'une triglycéride lipase hormono-sensible et d'une lipase intracellulaire) ou la circulation sanguine (action des lipoprotéines lipases membranaires). Les acides gras libérés diffusent dans la circulation sanguine puis sont transportés vers d'autres tissus tels que les muscles squelettiques et le foie qui les utilisent à des fins énergétiques, via la β-oxydation. Selon la taille des acides gras, la β-oxydation se produit dans la matrice mitochondriale ou dans les peroxysomes. Une fois dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA subissent des réactions successives conduisant à la formation d'acétyl-coenzyme A et de coenzymes réduits.

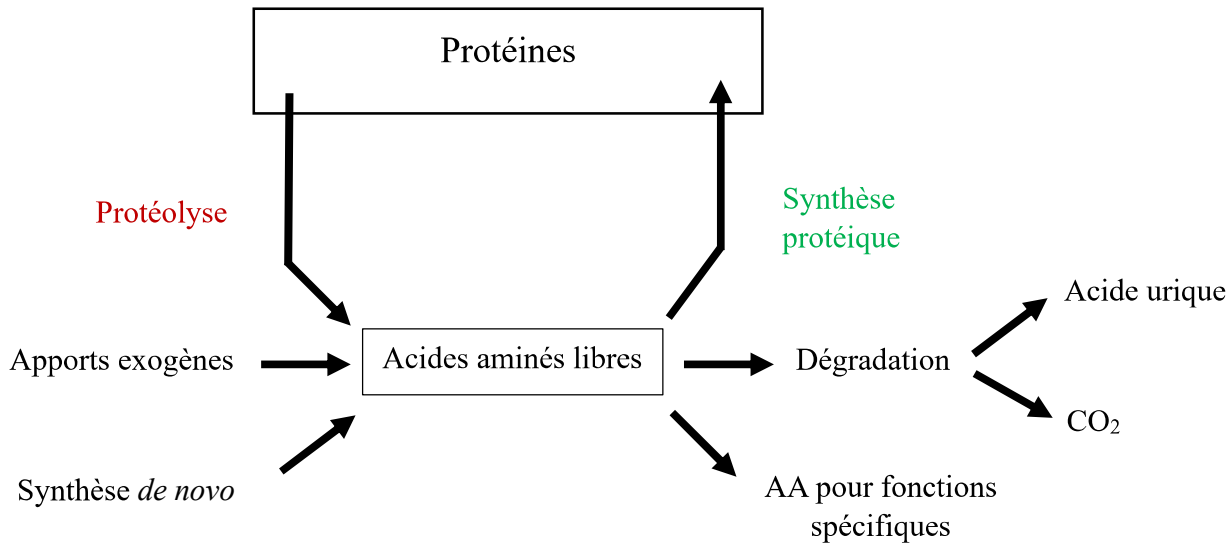


Figure 11 : Schéma général du métabolisme protéique.

Les principales voies de production et d'utilisation des acides aminés sont : la synthèse protéique, la protéolyse et la dégradation irréversible des acides aminés. L'acide urique et le CO_2 sont les produits terminaux du métabolisme protéique.

Le fonctionnement de la β-oxydation nécessitant la réoxydation des coenzymes, cette voie ne peut être réalisée qu'en condition aérobie. Les principales protéines impliquées dans le transport des acides gras sont la translocase CD36, les protéines de liaison (FABPs) et de transport des acides gras (FATPs). Selon Cogburn et al. (2018), l'embryon présente une croissance exponentielle entre E13 et E18, lorsque l'énergie nécessaire à la croissance provient de la β-oxydation des acides gras dérivés du vitellus.

3. *Peroxydation des lipides et statut antioxydant*

Chez le poulet, les tissus embryonnaires contiennent une proportion élevée d'acides gras hautement polyinsaturés et ont donc besoin d'une défense antioxydante. Le système antioxydant de l'embryon en développement et du poussin nouvellement éclos comprend des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase [SOD], glutathion peroxydase [GPx], catalase [CAT]), des antioxydants hydrosolubles (taurine, carnitine, glutathion), liposolubles (vitamine E, caroténoïdes) et du sélénium. Les niveaux élevés d'antioxydants endogènes dans l'œuf et les tissus embryonnaires pourraient ainsi être le reflet d'un mécanisme adaptatif majeur pour la protection des tissus lors d'un stress oxydatif tel que la peroxydation des lipides (Surai et al., 2016). Au niveau hépatique, la régulation à la baisse de la β-oxydation, durant la période péri-éclosion, permet d'alléger la charge oxydative des acides gras libres sur les mitochondries et de réduire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Surugihalli et al., 2019).

C. Métabolisme protéique

1. *Synthèse protéique*

La masse protéique corporelle résulte de processus dynamiques et simultanés tels que la synthèse protéique et la protéolyse, qui constituent le renouvellement (turnover) protéique (**Fig. 11**). Chez l'animal en croissance, les dépôts protéiques sont donc le reflet de la différence entre les vitesses de synthèse et de dégradation (Tesseraud, 1995). Selon les organes considérés, les protéines vont participer de façon très variable au renouvellement protéique global. Le renouvellement des protéines est particulièrement intense dans les viscères (e.g., foie, intestin), et il est plus lent dans les muscles qui contribuent davantage, en raison de leur masse, à la synthèse protéique du corps entier.

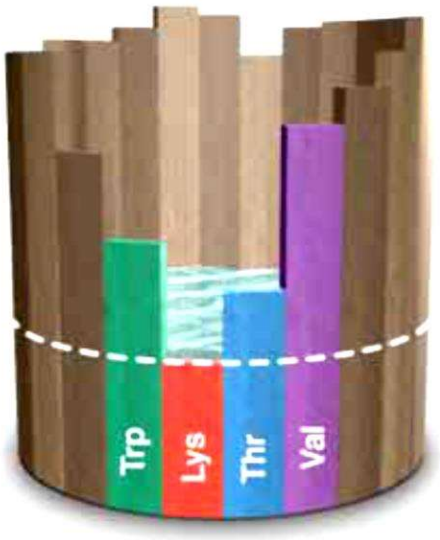


Figure 12 : Représentation du concept d'acide aminé limitant avec la lysine.

Tableau 1 : Liste des acides aminés essentiels et non essentiels chez les volailles (Wu, 2009).

Acides aminés essentiels	Acides aminés non essentiels
Arginine	Alanine
Glycine	Asparagine
Histidine	Aspartate
Isoleucine	Cystéine *
Leucine	Glutamate
Lysine	Glutamine *
Méthionine	Sérine
Phénylalanine	Taurine
Proline	Tyrosine
Thréonine	
Tryptophane	
Valine	

* *Acides aminés considérés comme essentiels chez les nouveau-nés et dans des conditions de stress.*

L'existence d'un renouvellement rapide permet une meilleure adaptation de celui-ci aux différentes situations nutritionnelles et physiopathologiques.

La synthèse protéique comprend trois grandes étapes :

- La transcription de l'ADN en ARNm
- La traduction de l'ARNm en un peptide
- La maturation

La transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en acide ribonucléique messager (ARNm) est la première étape de l'expression des gènes en protéines. Elle se déroule dans le noyau des cellules sous l'action des hélicases et de l'ARN polymérase. La seconde étape appelée « traduction » a lieu dans le cytoplasme des cellules et fait intervenir les ribosomes, organites considérés comme les établis de la synthèse protéique. L'efficacité ribosomale correspond à l'activité de la synthèse protéique rapportée à la quantité d'ARN présent tandis que la capacité ribosomale correspond aux possibilités de synthèse maximum d'une protéine par une cellule et s'exprime en quantité d'ARN disponible par rapport à la quantité de protéines tissulaires. La maturation correspond aux multiples phénomènes post-traductionnels qui vont permettre d'obtenir une protéine fonctionnelle (e.g., acquisition de structures secondaires, tertiaires et quaternaires, glycosylation, modification de certains acides aminés…).

L'absence ou la faible disponibilité d'un seul acide aminé suffit à ralentir, voire bloquer l'ensemble des synthèses protéiques (concept d'acide aminé limitant, **Fig. 12**). D'après Kino et Okumura (1986), la sévérité d'une carence en acide(s) aminé(s) ne dépendrait pas seulement de l'importance du déficit mais serait aussi fonction de l'acide aminé. En effet, certains acides aminés dits essentiels ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (**Tableau 1**). Chez les oiseaux, la méthionine et la lysine sont les deux premiers acides aminés limitants.

2. *Protéolyse ou catabolisme protéique*

Les principaux systèmes protéolytiques responsables de la dégradation des protéines en acides aminés sont :

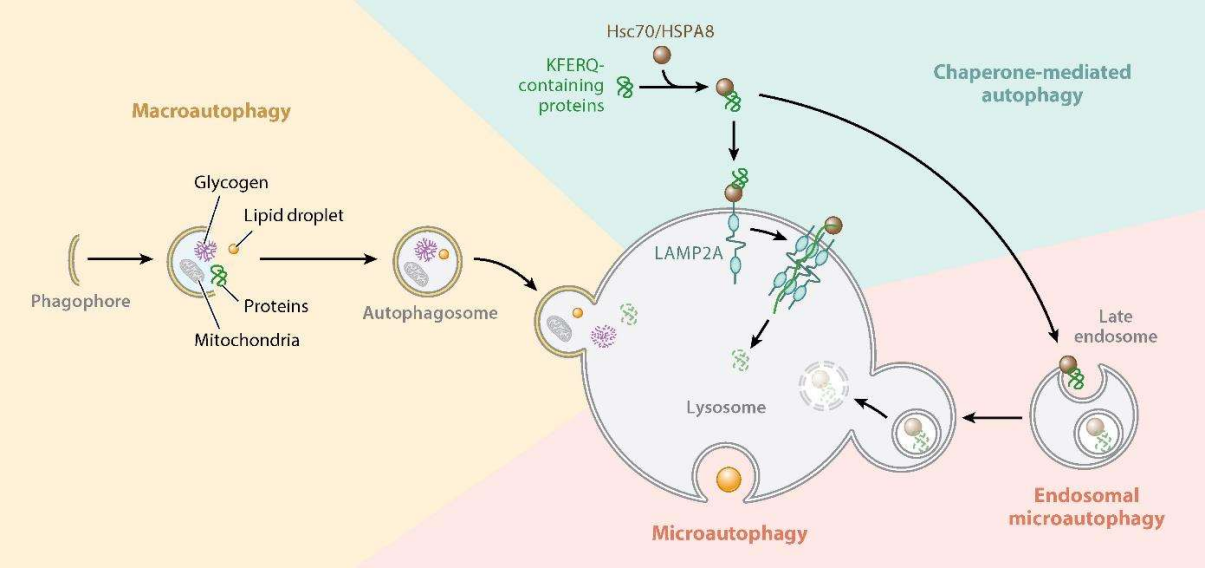


Figure 13 : Représentation des différentes voies de l'autophagie (Panserat et al., 2019).

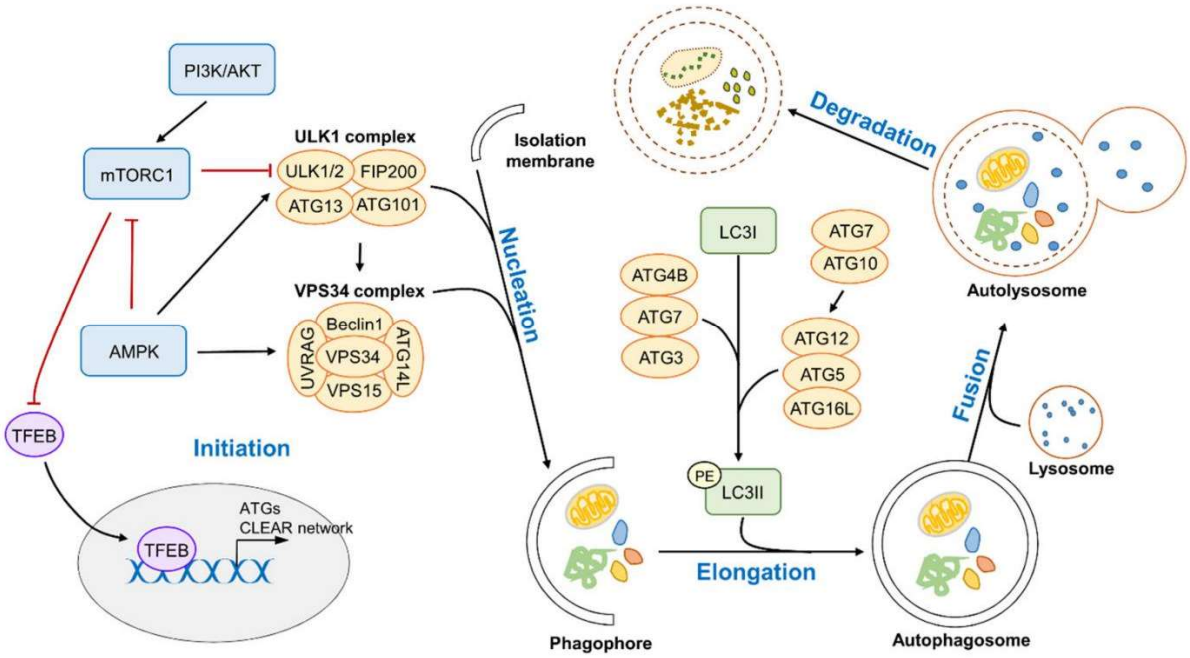


Figure 14 : Différentes étapes de la macroautophagie : principale forme d'autophagie dans les cellules.

- **Le système lysosomal**

Les lysosomes sont des organites vésiculaires contenant des enzymes hydrolytiques et protéolytiques telles que les cathepsines dont on distingue plusieurs types selon leur spécificité et leur pH d'action (cystine, sérine et aspartate protéinases). Ce mode de dégradation est particulièrement important dans les organes qui ont un renouvellement protéique rapide comme le foie. Il nécessite de l'énergie sous forme d'ATP. D'après Paudel et al. (2023), l'autophagie fait partie des processus de dégradation assurés par les lysosomes. Au niveau hépatique, l'autophagie permet la mobilisation des réserves intracellulaires d'énergie et de nutriments (e.g., lipides, protéines, glycogène), la dégradation d'enzymes clés du métabolisme intermédiaire et l'élimination des mitochondries endommagées ou obsolètes (Panserat et al., 2019). Dans les muscles squelettiques, l'autophagie est impliquée dans plusieurs étapes de la régénération telles que la dégradation des myofibres nécrotiques, le maintien de la quiescence, activation, prolifération et différenciation des cellules souches, le remodelage du réseau mitochondrial et l'angiogenèse. Elle peut également influencer le microenvironnement immunitaire du muscle (Chen et al., 2022).

Actuellement, trois formes d'autophagie sont identifiées (**Fig. 13**) :

- Macroautophagie : Variante de l'autophagie la mieux caractérisée à ce jour. Elle débute par la formation d'une membrane, appelée phagophore, qui va peu à peu s'étendre pour former les autophagosomes, vésicules à double membrane qui capturent les composants intracellulaires altérés. Ce processus se produit grâce à l'action coordonnée des ATG (**Fig. 14**). Les autophagosomes fusionnent ensuite avec des endosomes et des lysosomes, ce qui entraîne la dégradation des éléments emprisonnés (e.g., glycogène, gouttelettes lipidiques, mitochondries, ribosomes) et le recyclage dans le cytosol des métabolites ainsi produits.

- Microautophagie : Internalisation de la cargaison par invagination de la membrane lysosomale.

- Autophagie médiée par des chaperonnes : Mécanisme sélectif par lequel les protéines contenant un motif de type KFERQ sont reconnues par le chaperon HSPA8/HSC70. Les protéines destinées à être dégradées sont directement acheminées vers le lysosome.

- **Le système protéolytique dépendant du calcium (calpaïnes)**

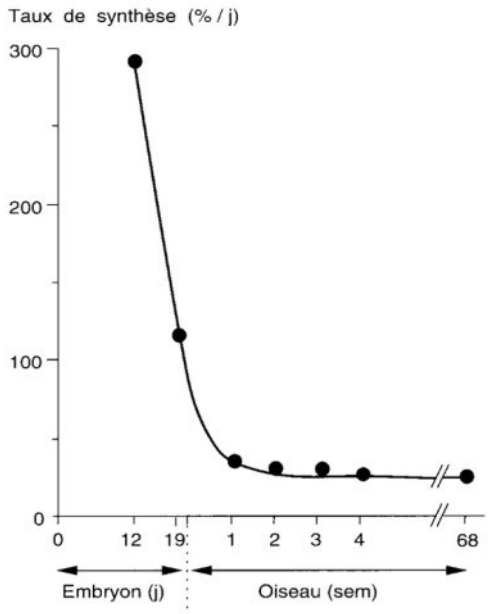


Figure 15 : Evolution avec l'âge du taux de synthèse des protéines corporelles (Ks en %/j) chez le poulet (Muramatsu et al., 1987).

Les calpaïnes (μ-calpaïne et m-calpaïne) sont des protéases cytosoliques dont l'activité est étroitement liée à la concentration intracellulaire en calcium. Selon Goll et al. (2008), la calpastatine est l'inhibiteur spécifique des calpaïnes *in vivo*.

- **Le système protéolytique non lysosomal dépendant de l'ATP (système ubiquitine-protéasome)**

Cette voie implique l'étiquetage de la protéine à éliminer par l'addition de molécules d'ubiquitine (peptides de 76 acides aminés) qui seront reconnues par un complexe protéolytique : le protéasome (20S et 26S). Le processus d'ubiquitination est médié par une cascade d'enzymes (E1 : enzyme activatrice de l'ubiquitine, E2 : enzyme conjuguant l'ubiquitine, E3 : ubiquitine ligase) qui transfère les molécules d'ubiquitine aux cibles cellulaires de manière séquentielle. Une fois la protéine poly-ubiquitinée, au niveau des résidus lysine, elle est reconnue par le protéasome qui la dégrade en acides aminés et en peptides courts. Cette voie ATP dépendante représente la majorité de la protéolyse au niveau musculaire.

3. *Evolution du métabolisme protéique au cours du développement embryonnaire et post-éclosion*

D'après Tomas et al. (1991), la protéosynthèse serait davantage influencée par l'âge de l'animal ou les facteurs environnementaux et nutritionnels plutôt que par les caractéristiques génétiques. En effet, le taux de synthèse protéique diminue avec l'âge de l'animal, de manière plus ou moins marquée selon les tissus et la période considérée.

Chez les oiseaux, les principaux changements ont lieu au cours du développement embryonnaire pour répondre aux exigences de croissance et de développement. En 1987, Muramatsu et ses collaborateurs ont constaté une forte réduction du taux de synthèse des protéines corporelles chez l'embryon entre le 12ème et 19ème jour (E19) du développement embryonnaire (**Fig. 15**). La capacité ribosomale suit la même évolution que le taux de synthèse protéique alors que l'efficacité traductionnelle reste inchangée. Au cours de l'avancée en âge, les variations dans le taux de synthèse sont liées au potentiel de synthèse. A contrario, il semble difficile de conclure sur l'évolution du taux de dégradation qui, selon les études, diminue ou reste inchangé en fonction de l'âge des animaux (Tesseraud, 1995 ; Tesseraud et al., 1996).

L'analyse protéomique menée par Peng et al. (2018) a permis de mettre en évidence les changements dans l'abondance des protéines hépatiques au cours du développement embryonnaire chez le poulet. Au total, 293 protéines présentant des différences d'abondance ont été identifiées entre le 14ème et le 19ème jour du développement embryonnaire (E14 et E19) contre 160 entre E19 et l'éclosion. Pour répondre aux besoins liés à la croissance et au développement des embryons, les voies en lien avec la dégradation des acides gras, la néoglucogenèse et le devenir des protéines dans le réticulum endoplasmique ont été augmentées entre E14 et E19. L'augmentation des protéines ribosomales entre E19 et l'éclosion semble indiquer que la glycolyse n'est pas le processus privilégié pour produire de l'énergie à l'approche de l'éclosion contrairement au métabolisme des protéines et des purines. Les protéines dont l'abondance est augmentée sont généralement associées à des processus métaboliques essentiels lors du développement tandis que les protéines dont l'abondance est diminuée témoignent d'une dégradation et d'une absorption par l'embryon. Ces résultats ont été étayés par l'étude du métabolome sérique à E14, E19 et l'éclosion. Au total, 39 métabolites discriminants ont été identifiés entre E14 et E19 contre 68 entre E19 et l'éclosion (Peng et al., 2018). L'analyse d'enrichissement a révélé que les métabolites discriminants entre E14 et E19 étaient principalement associés à la biosynthèse des protéines, la néoglucogenèse, le métabolisme des acides aminés, des hormones stéroïdiennes, du pyruvate, du galactose et des nucléotides. En comparaison, les métabolites discriminants entre E19 et l'éclosion étaient principalement impliqués dans le métabolisme des purines, le métabolisme du glutamate, le cycle de l'urée, le recyclage de l'ammoniac, la transcription de l'ARN et la biosynthèse des protéines.

4. Spécificités chez les oiseaux

En fonction des espèces, l'azote peut être éliminé sous trois formes : l'ammoniac (invertébrés aquatiques, poissons), l'acide urique (invertébrés terrestres, oiseaux, reptiles) et l'urée (mammifère). Chez les espèces uricotéliques, l'acide urique est majoritairement synthétisé dans le foie (Burns & Buttery, 1984) à partir des protéines alimentaires et de la dégradation des purines (adénine et guanine) par la xanthine oxydase (Ding et al., 2021). Ce composé contient quatre atomes d'azote provenant de la glycine, l'aspartate et la glutamine mais également cinq atomes de carbone, dont deux sont fournis par la glycine, un par le CO_2 et deux par le 10-formyltétrahydrofolate (Van Milgen, 2021). Outre sa fonction de déchet, l'acide urique est considéré comme un antioxydant. En général, les concentrations en acide urique sont beaucoup

plus élevées chez les espèces aviaires que chez les autres vertébrés, ce qui suggère un mécanisme de protection contre les dommages oxydatifs plus important chez ces espèces et particulièrement chez les poulets de chair qui ont une croissance rapide et un métabolisme de base élevé (Tsahar et al., 2006). Ce dernier correspond à l'énergie minimum, mesurée au repos, dont l'organisme a besoin pour assurer ses fonctions vitales au quotidien (digestion, respiration, maintien d'une température optimale…). Il dépend de l'âge, du sexe, de l'activité thyroïdienne et du turnover protéique.

D. Métabolisme glucidique

1. *Glycémie et insulinémie*

En comparaison aux mammifères, les oiseaux sont considérés comme insulino-résistants. La concentration en glucose dans le sang des oiseaux est deux fois supérieure à celle observée chez les mammifères avec des valeurs pouvant aller de 1,90 à 2,20 g/L (Franssens et al., 2016). L'insensibilité relative à l'insuline semble toutefois moindre durant les premiers jours de vie des poussins (Tokushima et al., 2003).

L'insuline peut agir sur la plupart des tissus mais son action porte principalement sur le muscle, le tissu adipeux et le foie. Chez l'embryon de poulet, l'insuline est synthétisée par les cellules β du pancréas à partir du 4ème jour d'incubation mais n'est produite en grande quantité qu'à partir du 12ème jour d'incubation environ (Bellairs et Osmond, 1998 ; Manáková et Titlbach, 2007). Sa concentration dans le plasma augmente progressivement au cours du développement embryonnaire et de la première semaine de vie (Lu et al., 2007). Comme chez les mammifères, l'insuline joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie glucidique (Shimamoto et al., 2016). Elle stimule l'entrée du glucose dans les cellules, favorise son stockage sous forme de glycogène ou son utilisation via la glycolyse et possède des effets anaboliques sur la synthèse des protéines, des acides gras et des triglycérides. A l'inverse, l'insuline inhibe les processus cataboliques tels que la glycogénolyse, la lipolyse et la protéolyse. Chez les poulets, la signalisation de l'insuline dans le foie est similaire à celle des mammifères. Au niveau musculaire, les poulets diffèrent des mammifères dans les premières étapes de la cascade de signalisation de l'insuline. L'hyperactivité de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) semblerait induire un rétrocontrôle négatif, désensibilisant ainsi le muscle à l'insuline (Duchêne et al., 2008 ; Dupont et al., 2009). Le muscle est donc réfractaire aux variations induites par l'état

nutritionnel et/ou des conditions expérimentales impliquant des injections d'insuline (Dupont et al., 2008). Dans le foie, les effets d'une injection de sérum contenant des anticorps anti-insuline sont similaires à ceux observés après un jeûne de 5 heures. Au bout d'une heure, l'injection induit une diminution significative des niveaux de phosphorylation du récepteur à l'insuline (IR) et de son substrat (IRS-1) ainsi qu'une diminution de l'activité de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Les phosphorylations de la protéine kinase B (AKT), de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et de la protéine ribosomale S6 (RPS6) sont également inhibées.

2. *Importance des glucides pendant l'embryogenèse*

Les glucides sont particulièrement importants pendant les périodes où la disponibilité en oxygène est limitée et l'utilisation des lipides peu efficace (Maatjens et al., 2017). Les concentrations initiales en glucides étant relativement faibles dans l'œuf, la néoglucogenèse hépatique est considérée comme un processus essentiel pour fournir du glucose au cours de l'embryogenèse (Han et al., 2016). Contrairement au foie qui libère du glucose dans la circulation sanguine pour approvisionner d'autres tissus en énergie, le muscle mobilise ses réserves en glycogène pour produire du glucose et assurer son propre fonctionnement. D'après Dayan et al. (2023), le foie constitue le principal site d'activité du métabolisme du glycogène. Toutefois, les quantités de glycogène présentes dans les muscles sont plus élevées que dans le foie en raison de leur masse et de leur capacité de stockage plus importante.

3. *Transport du glucose dans le foie et les muscles squelettiques*

Le transport du glucose dans les cellules est une étape limitante dans l'utilisation périphérique du glucose et la régulation de la glycémie. Les GLUTs (transporteurs codés par les gènes *SLC2A**) assurent le transport du glucose par diffusion facilitée tandis que les SGLTs (co-transporteurs sodium/glucose) assurent le transport des monosaccharides par transport actif, au niveau intestinal. Les GLUTs présentent des particularités au niveau de leur distribution dans l'organisme (ubiquitaire ou tissu-spécifique), de leur degré d'affinité pour le glucose et de leur sensibilité à l'insuline. GLUT8 est un transporteur de glucose sensible à l'insuline dont l'expression est ubiquitaire dans tous les tissus tandis que GLUT1 est un transporteur constitutif qui régule le transport basal du glucose (Chadt et Al-Hasani, 2020). GLUT2 est exprimé uniquement dans le foie et les reins tandis que GLUT3 est fortement exprimé dans le cerveau

(Kono et al., 2005). GLUT4 est le principal transporteur insulino-sensible chez les mammifères. Il est exprimé exclusivement dans les muscles squelettiques, le cœur et le tissu adipeux. Bien que GLUT4 n'existe pas chez les poulets, un transporteur GLUT12 pourrait jouer le rôle de transporteur insulino-sensible au niveau du muscle chez l'oiseau. A l'heure actuelle, il est le seul transporteur de glucose pour lequel une translocation à la membrane a été montrée suite à une stimulation à l'insuline (Coudert et al., 2015). Le muscle squelettique est considéré comme le tissu le plus important dans le captage du glucose. D'après Shimamoto et al. (2016), les niveaux d'expression des gènes *SLC2A1*, *SLC2A3* et *SLC2A8* sont plus élevés dans le muscle *Pectoralis major* (métabolisme glycolytique) que dans le muscle *Sartorius* et le biceps fémoral (métabolisme oxydo-glycolytique) des poussins nouvellement éclos. Dans le muscle *Pectoralis major*, *SLC2A1* est principalement exprimé au 12ème jour du développement embryonnaire (E12) et au 5ème jour post-éclosion (J5) (Coudert et al., 2018). Pour les transporteurs insulino-dépendants, *SLC2A8* est principalement exprimé à l'éclosion tandis que l'expression de *SLC2A12* augmente progressivement au cours de la cinétique. D'après Carver et al. (2001), le gène *SLC2A3* présente un profil d'expression similaire à *SLC2A1.*

4. *Néoglucogenèse et glycolyse*

La néoglucogenèse permet la synthèse de glucose à partir de molécules non glucidiques tels que le pyruvate et le lactate (glycolyse et fermentation lactique), les intermédiaires du cycle de Krebs, les acides aminés glucoformateurs et le glycérol (dégradation des triglycérides). Dans des conditions de jeûne, les principales enzymes régulatrices de cette voie telles que la glucose-6-phosphatase (G6PC), la fructose-1,6-bisphosphatase (FBP), la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la pyruvate carboxylase (PC) sont activées (Han et al., 2016).

Les voies métaboliques impliquées dans le catabolisme des glucides permettent la mobilisation des réserves et l'oxydation des oses simples. Les deux principales voies de dégradation des oses sont la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Elles conduisent respectivement à la synthèse d'ATP et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH).

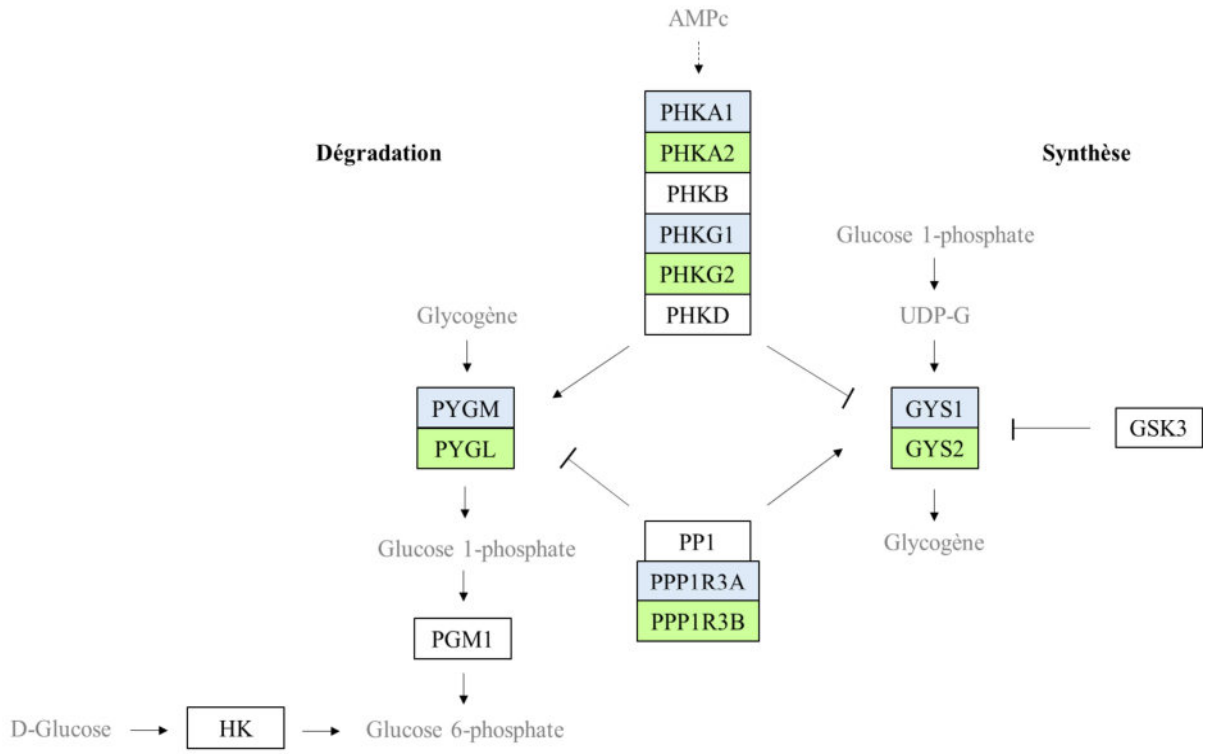


Figure 16 : Acteurs moléculaires impliqués dans la synthèse et la dégradation du glycogène. Figure adaptée de Beauclercq et al., 2015.

En bleu, les isoformes exprimées uniquement dans le muscle et en vert, les isoformes exprimées uniquement dans le foie. PHK : Phosphorylase kinase ; GYS : Glycogène synthase ; PYG : Glycogène phosphorylase ; GSK3 : Glycogène synthase kinase 3 ; PP1 : Protéine phosphatase 1 ; PPP1R3A et B : Sous-unités régulatrices 3A et 3B de la PP1 ; PGM1 : Phosphoglucomutase 1 ; HK : Hexokinase ; UDP-G : Uridine diphosphate glucose.

En anaérobiose, le pyruvate est réduit en lactate via la fermentation lactique tandis qu'en aérobiose et présence de mitochondries, il entre dans le cycle de Krebs après avoir subi une décarboxylation oxydative. Cette dernière permet l'oxydation complète du glucose et la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Les enzymes limitant la vitesse de la glycolyse sont l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK). La voie des pentoses phosphates est une voie au cours de laquelle le glucose est oxydé en fructose 6-phosphate (Fru-6-P) et en glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P). Elle est très active dans les tissus synthétisant du cholestérol et des acides gras (e.g., foie et tissu adipeux).

5. *Glycogénèse et glycogénolyse*

Les molécules de glycogène sont synthétisées et dégradées par des processus différents, ce qui présente l'avantage d'une meilleure régulation du métabolisme cellulaire (**Fig**. **16**). Ces processus nécessitent plusieurs niveaux de régulation avec l'activation de la glycogène synthase (GYS) d'une part, et l'inhibition de la glycogène phosphorylase (PYG) d'autre part (Han et al., 2016). D'après Agius (2015), l'augmentation de la concentration en glucose dans la veine porte est l'une des principales causes de la transition métabolique entre la dégradation du glycogène hépatique et sa synthèse. La glycogénolyse correspondant à la dégradation du glycogène est catalysée par la forme active de la PYG. Cette réaction aboutit à la formation de glucose 1-phosphate qui peut être converti en glucose 6-phosphate par la phosphoglucomutase 1 (PGM1). L'interconversion entre la forme active (phosphorylée) et inactive (non phosphorylée) dépend des activités de la phosphorylase kinase (PHK) et de la protéine phosphatase 1 (PP1). L'isoforme musculaire de la PYG est activée par la phosphorylation de la sérine 14 mais également par liaison d'effecteurs tels que l'adénosine monophosphate (AMP). Malgré un degré élevé de conservation entre l'isoforme musculaire et hépatique, cette dernière possède une affinité plus faible pour l'AMP, ce qui implique une contribution plus importante du glucose comme ligand (Agius, 2015). A l'inverse, la GYS favorise l'allongement des chaînes de glycogène. Le glucose et la signalisation à l'insuline activent la protéine AKT qui à son tour phosphoryle et inactive la GSK3, entrainant ainsi l'activation de la GYS.

E. Principaux régulateurs du métabolisme

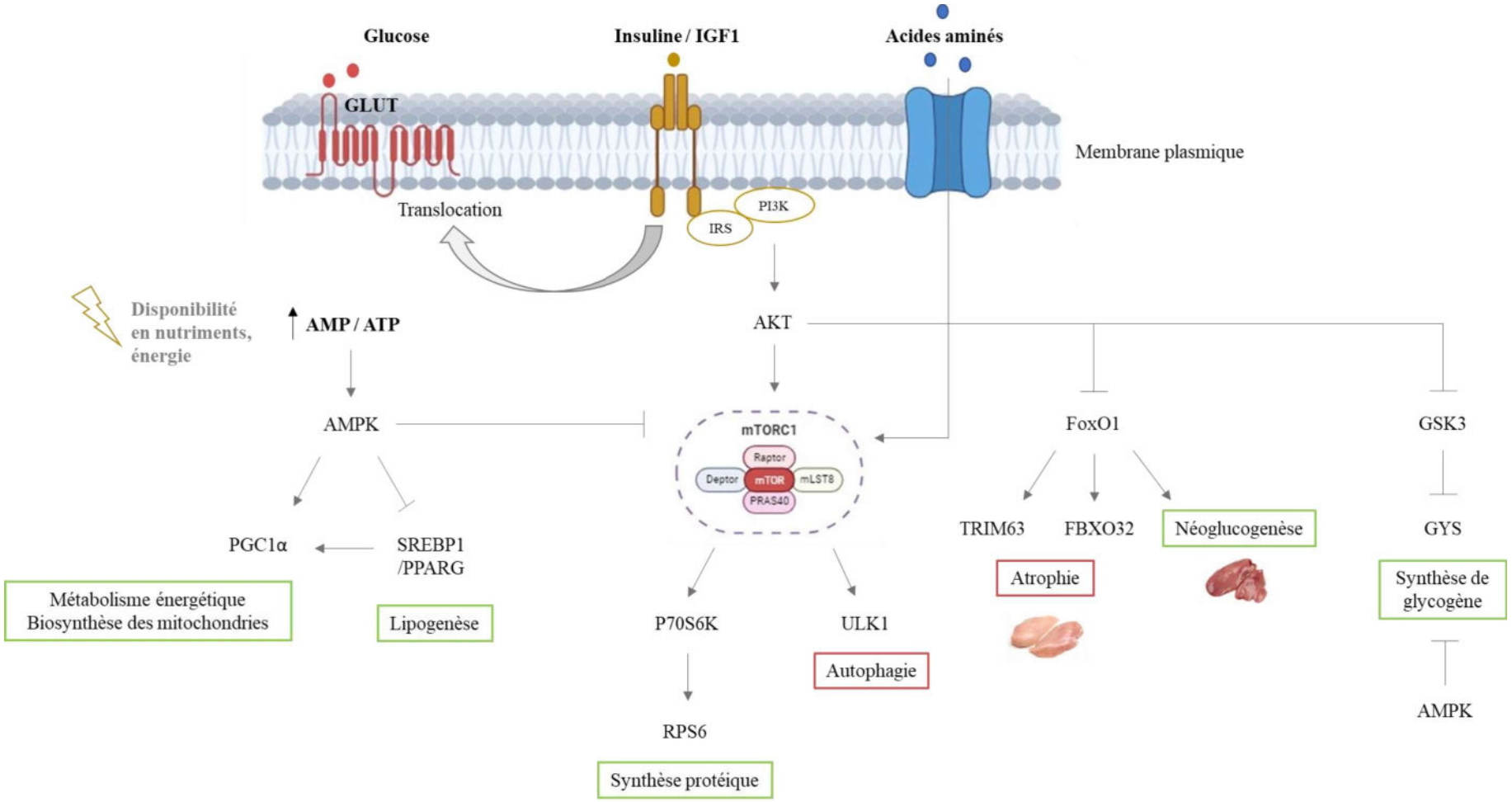


Figure 17 : Principales voies contrôlant le métabolisme ainsi que les fonctions hépatiques et musculaires.

IGF1 : Insulin like growth factor 1 ; IRS : Insulin receptor substrate ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; Akt : Protein kinase B ; mTOR : Target of rapamycin ; Raptor : Regulatory associated protein of MTOR complex 1 ; P70S6K : Ribosomal protein S6 kinase (70 kDa) ; RPS6 : Ribosomal protein S6 ; ULK1 : unc-51 like autophagy activating kinase 1 ; FoxO1 : Forkhead box O1 ; TRIM63 : RING-type E3 ubiquitin transferase (MuRF-1) ; FBXO32 : F-box protein 32 (Atrogin-1) ; GSK3 : Glycogen synthase kinase 3 ; GYS : Glycogen synthase ; AMP : Adenosine monophosphate ; ATP : Adenosine triphosphate ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; PGC1α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha ; SREBP1 : Sterol regulatory element binding transcription factor 1 ; PPARG : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

L'insuline est la principale hormone contrôlant les fonctions énergétiques telles que le métabolisme du glucose, des lipides et des protéines (Saltiel et Kahn, 2001 ; Haeusler et al., 2018) (**Fig. 17**). L'insuline et le facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF1) présentent un degré élevé d'homologie structurelle et fonctionnelle. Il en va de même pour leurs récepteurs respectifs, ce qui entraîne des effets croisés sur la croissance et le métabolisme (Caputo et al., 2021). En se fixant sur son récepteur membranaire (IR), l'insuline induit la phosphorylation de substrats tels que IRS1 qui présente des sites de liaison pour de nombreux partenaires de signalisation. Parmi eux, la PI3K joue un rôle majeur dans l'activation d'AKT qui favorise la synthèse du glycogène par l'inhibition de la GSK3 et la synthèse des protéines par l'intermédiaire de mTOR et des éléments en aval (P70S6K, RPS6). AKT phosphoryle et inhibe directement les facteurs de transcription FoxO, qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la résistance au stress oxydatif (catalase, etc.), l'autophagie (ATG, etc.) et la protéolyse (ubiquitines ligases TRIM63 et FBXO32). Dans un contexte d'adaptation du métabolisme cellulaire au statut nutritionnel, FoxO1 coordonne l'ensemble des voies métaboliques qui permettent de maintenir une glycémie normale (néoglucogenèse). Dans les tissus insulino-dépendants tels que les muscles et le tissu adipeux, l'insuline stimule le transport du glucose grâce à un phénomène de translocation des transporteurs de glucose sur la membrane des cellules. Pour terminer, la voie de signalisation de l'insuline inhibe l'autophagie par l'intermédiaire de la kinase ULK1 et favorise la synthèse des acides gras par la régulation des facteurs de transcription SREBP.

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase présente dans deux complexes distincts : mTORC1 et mTORC2 (Laplante et Sabatini, 2012 ; Ben-Sahra et Manning, 2017). Le complexe mTORC1 qui intègre Raptor détecte et intègre divers signaux nutritionnels et environnementaux (facteurs de croissance, niveaux d'énergie, stress cellulaire, acides aminés) afin de réguler réciproquement des processus anaboliques (synthèse des protéines, des lipides, etc.) et cataboliques (autophagie). En comparaison, le complexe mTORC2 favorise la survie cellulaire, régule l'organisation du cytosquelette et contrôle le transport des ions.

L'AMPK est un régulateur clé de l'homéostasie énergétique cellulaire (Lin et Hardie, 2018 ; Ke et al., 2018). Elle est activée lors d'une augmentation des rapports AMP/ATP - ADP/ATP et agit pour rétablir l'équilibre énergétique en activant des voies cataboliques qui génèrent de l'ATP (oxydation des acides gras, glycolyse, autophagie, etc.) tout en désactivant des voies anaboliques (synthèse des protéines, du glycogène, etc.) et autres processus qui consomment de l'ATP.

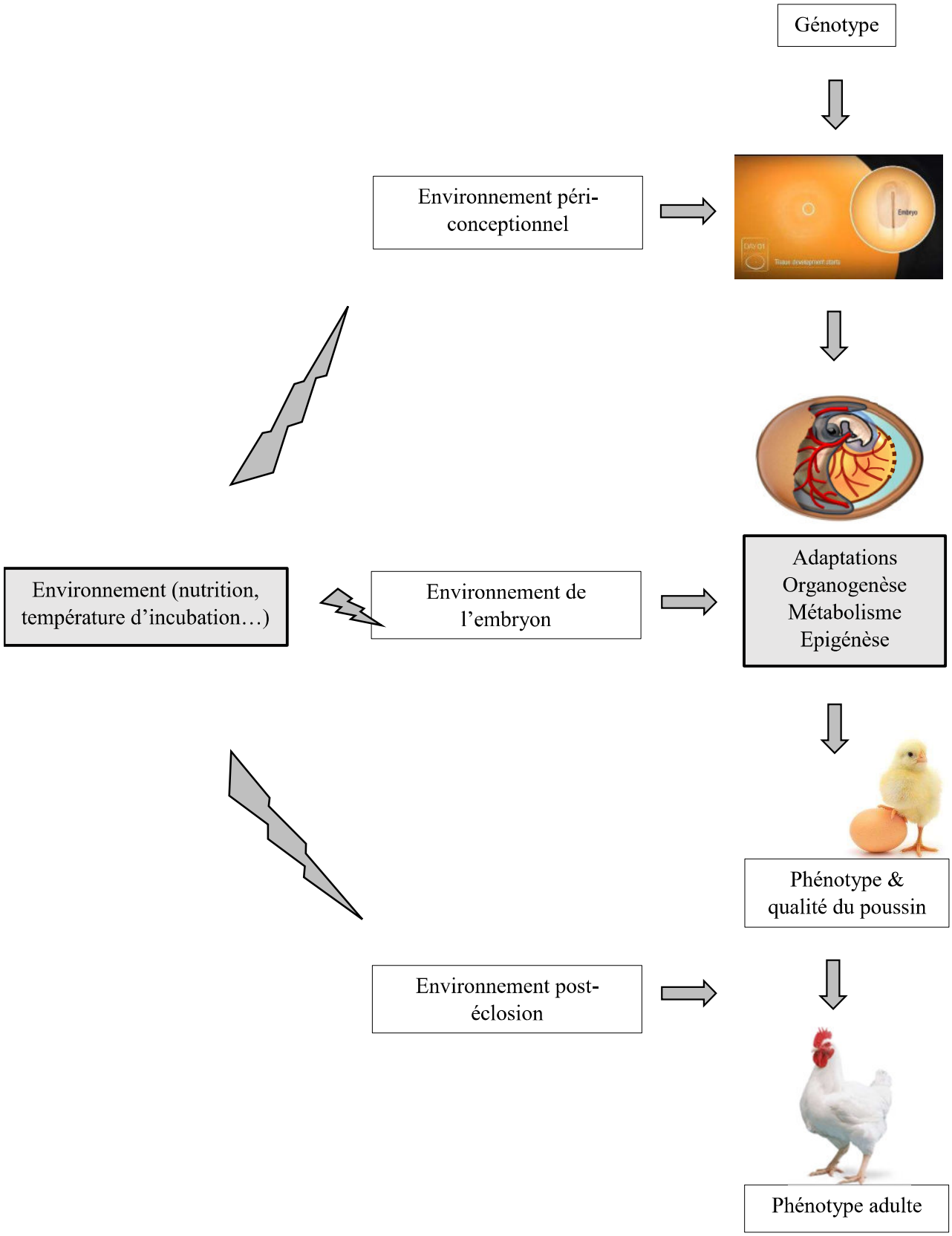


Figure 18 : Impact de l'environnement et de la génétique sur l'établissement des phénotypes.

Selon le concept de la DOHaD (Developmental Origin of Health and Disease).

Elle existe sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité α catalytique et de sous-unités β et γ régulatrices. Les sous-unités α1, β2 et γ1 sont préférentiellement exprimées dans le foie tandis que les sous-unités α2, β2 et γ3 sont plus exprimées dans le muscle.

L'absorption des nutriments et leur métabolisme intracellulaire est un processus hautement contrôlé qui implique un dialogue entre les signaux liés à la croissance et les voies métaboliques (Szwed et al., 2021). Les acides aminés dits « fonctionnels » sont capables de réguler des voies métaboliques clés nécessaires à la croissance, à la reproduction, à la défense antioxydante ou encore à l'immunité. Ils interviennent comme molécules de signalisation cellulaire mais aussi comme régulateurs de l'expression génétique et de la cascade de phosphorylation des protéines (Tesseraud et al., 2009 ; Wu, 2009). Certains acides aminés comme la glutamine, l'arginine et la leucine sont connus pour stimuler la phosphorylation de mTOR, régulant ainsi le renouvellement des protéines intracellulaires (Escobar et al. 2006 ; Meijer et Dubbelhuis 2004).

III. Influence de la nutrition précoce sur l'orientation métabolique et la programmation des phénotypes

Le phénotype d'un individu dépend non seulement de son génotype, de son environnement mais aussi de tous les évènements vécus lors de la période d'incubation (**Fig. 18**). Le concept de programmation métabolique admet qu'il existe une mémoire des impacts précoces de l'environnement avec un effet à long terme sur le phénotype de l'individu (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014). L'alimentation fait partie des sources d'exposition précoces susceptibles d'impacter le développement et le phénotype ultérieur de l'animal. Déterminer les mécanismes par lesquels les nutriments *in ovo* régulent l'expression des gènes, les voies de signalisation ainsi que le métabolisme cellulaire est une étape essentielle pour améliorer l'utilisation des nutriments, la robustesse des animaux et l'efficacité des productions avicoles. Même si la composition de l'œuf est relativement stable, la supplémentation en micronutriments via l'alimentation des reproducteurs ou les injections *in ovo* est actuellement en plein développement. En amont de ma thèse, j'ai donc participé à un état des lieux sur les différentes stratégies nutritionnelles précoces et leur impact sur le phénotype des animaux (Métayer-Coustard et al., 2019). Des exemples ont ainsi été rapportés pour les acides gras, les acides aminés, les vitamines, les minéraux et les sucres. Toutefois, peu d'études sont allées

jusqu'à décrypter les mécanismes et les régulations impliqués dans les réorientations métaboliques observées.

INRA PRODUCTIONS ANIMALES

INRA SCIENCE & IMPACT

INRA Prod. Anim.,
2019, 32 (3), 417-430

Nouvelles stratégies alimentaires précoces au service de la production avicole

Sonia MÉTAYER-COUSTARD[1], Angélique PETIT[1], Maxime QUENTIN[2], Sophie TESSERAUD[1]
[1]BOA, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France
[2]INZO, 35766, Saint Grégoire, France
Courriel : sonia.metayer-coustard@inra.fr

Croissance, développement et robustesse : doit-on attendre l'éclosion pour réagir ? L'enrichissement de l'œuf en certains nutriments d'intérêt constitue une nouvelle stratégie de production qui vise à améliorer la qualité du poussin au démarrage, augmenter l'efficience de son métabolisme et obtenir des animaux adultes plus robustes pouvant s'adapter à des conditions d'élevage données tout en maîtrisant l'élaboration de produits de qualité.

Introduction

La population mondiale ne cesse de croître. Les besoins tant en céréales qu'en viande augmentent considérablement. La volaille constitue une source de protéines animales plébiscitée par l'homme, rapide à produire, peu chère et non concernée par les interdits religieux. La production de volailles est en constante progression (+ 2 % par an avec 107 MT en 2013) et occupe le second rang mondial derrière la viande de porc (114 MT) et loin devant la viande bovine (68 MT) (encadré 1).

Pour répondre à cette demande croissante, les poulets de chair ont été principalement sélectionnés pour une vitesse de croissance rapide. L'augmentation de poids corporel de poulets de chair par an est de l'ordre de 3,3 % par an (Zuidhof *et al.*, 2014) (figure 1). Le poulet étant abattu à un poids objectif allant de 1,7 à 3,5 kg vif, l'augmentation des vitesses de croissance a permis une diminution de l'ordre de 1 jour par an de l'âge d'abattage. En Europe, la durée d'élevage est de moins de 6 semaines pour des poulets de chair « standard » (Arnould *et al.*, 2011). Le squelette et les systèmes immunitaire et cardio-vasculaire n'ont pas suivi l'augmentation massive de la masse musculaire (Havenstein *et al.*, 2003 ; Tona *et al.*, 2003 ; Hocking, 2010).

Encadré 1. ***Évolution de la production mondiale des viandes (en Millions de Tonnes) (Source : Rapport annuel « Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO », 2014).***

En 2014, la production mondiale de viande de volailles était estimée à 110,5 MT, soit une augmentation de plus de 3 % par rapport à 2013 (107 MT). Les perspectives agricoles de la FAO montrent que l'on peut s'attendre à une progression de la production de viande de volailles de 1,8 % par an de 2015 à 2024. La filière volaille deviendrait alors d'ici 2020, la première production de viande dans le monde.

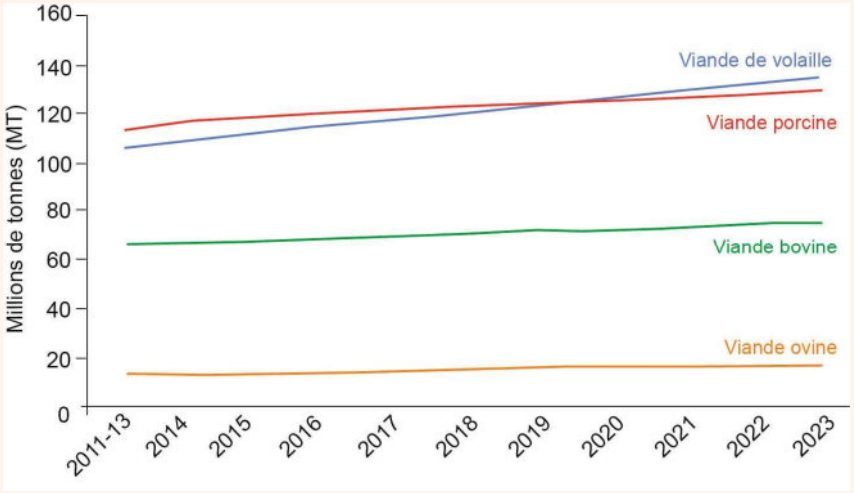
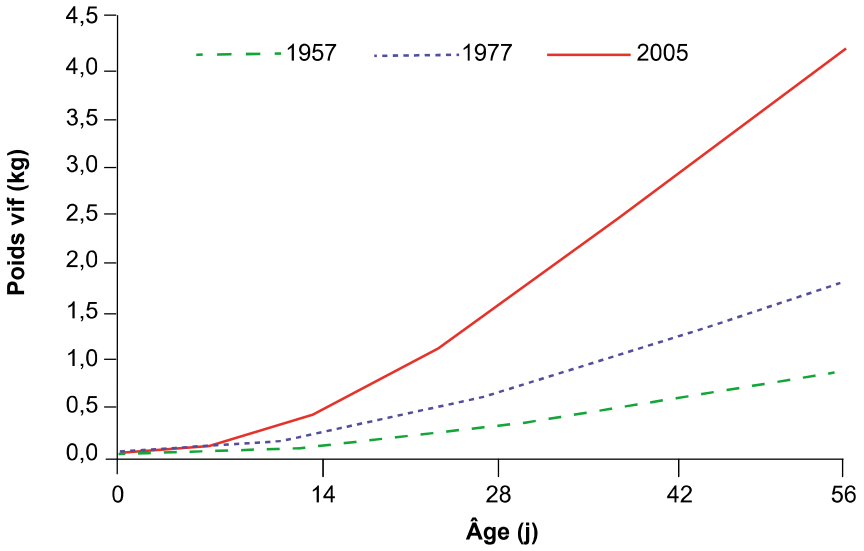


Figure 1. ***Évolution des poids vifs des poulets de chair non sélectionnés de 1957 et 1977, et du poulet Ross 308 (2005) (Adapté de Zuidhof* et al.*, 2014).***



Cette stratégie de sélection s'est inévitablement accompagnée d'effets indésirables tels qu'une fréquence plus importante de cas d'ascites, l'apparition de défauts de squelette et de viande, une certaine immunosuppression chez les animaux, une augmentation de leur sensibilité à des maladies infectieuses et de l'incidence de maladies métaboliques (Emmerson *et al.,* 1997 ; Decuypere *et al.,* 2003 ; Havenstein *et al.,* 2003). Il est à noter que les besoins alimentaires ont été établis essentiellement sur la base des performances de croissance des animaux jeunes sans prendre en compte d'autres fonctions telles que la fonction immunitaire ou plus largement la valence « santé ». Pour ce qui est des reproducteurs, une alimentation *ad libitum* conduit à une obésité excessive avec une capacité de reproduction très faible, une morbidité et un taux de mortalité élevés. Cette pratique a par ailleurs un impact sérieux sur le bien-être des oiseaux (Decuypere *et al.,* 2006 et 2010, De Jong et Guémené, 2011) et sur l'intégrité des animaux, qui va au-delà des préoccupations de santé et de bien-être (Decuypere *et al.,* 2010). L'intégration des deux aspects croissance et reproduction est relativement incompatible et est reconnue comme le paradoxe « croissance rapide *versus* reproduction – santé ».

Dans la filière « poulet de chair », une restriction alimentaire des reproducteurs est donc réalisée pour maximiser la production d'œufs et de poussins. De nos jours, les reproductrices reçoivent en moyenne 25 % de ce qu'elles consommeraient normalement en mode *ad libitum*. Cette restriction alimentaire sévère permet de maintenir la trajectoire du poids corporel dans des limites bien définies afin d'assurer une performance de reproduction correcte à l'âge adulte. Elle impacte cependant négativement la progéniture. En effet, la restriction des reproducteurs, les niveaux de production d'œufs soutenus ou autres stress peuvent faire varier la composition de l'œuf, qui peut alors être déficitaire en nutriments critiques nécessaires au bon démarrage du poussin. Dans ces conditions, et avec un délai entre l'éclosion et la mise en place en élevage pouvant aller jusqu'à 48 à 72 heures, ainsi que des conditions de transport souvent sub-optimales, la période de démarrage (1re semaine post-éclosion) est alors délicate, et les performances significativement impactées.

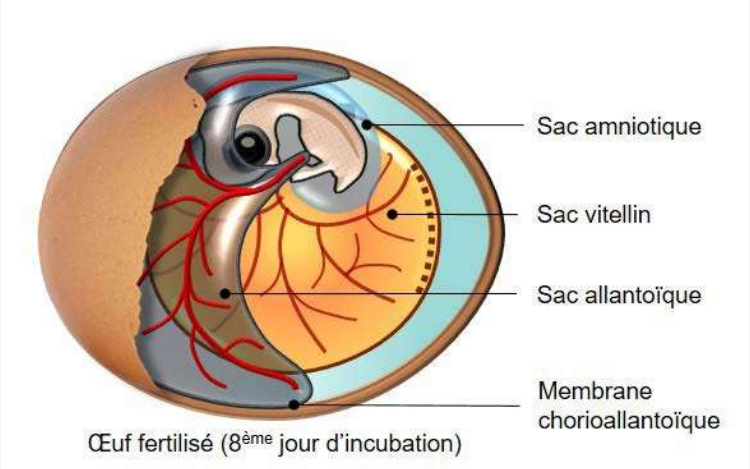
Chez les animaux en croissance, tout changement quantitatif (niveaux d'énergie et de protéines…) ou qualitatif (type de régime alimentaire, apport en nutriments ou schéma de distribution…) dans l'alimentation affecte le métabolisme. Cela a des conséquences sur la consommation d'énergie, l'efficacité alimentaire, la répartition des éléments nutritifs entre les tissus ou les organes et donc sur la composition corporelle et la qualité de la viande (Tesseraud *et al.,* 2014). Cette remarque est aussi valable pour un embryon en cours de développement. Une supplémentation en nutriments de l'œuf *via* l'alimentation maternelle ou *via* des injections *in ovo* (« in ovo *feeding* ») sont alors des stratégies innovantes pour optimiser l'apport de nutriments à l'embryon et améliorer les conditions de démarrage des poussins et leur robustesse. La période d'incubation et la première semaine d'âge sont essentielles pour leur santé, leur bien-être et leurs performances de croissance (Bigot *et al.,* 2003 ; Yassin *et al.,* 2009). La finalité de telles approches est d'optimiser les apports nutritionnels des reproductrices, des embryons en développement et/ou des poussins au démarrage dans le but d'obtenir des poussins de meilleure qualité en termes de robustesse, croissance et/ou composition corporelle en tirant parti de la plasticité embryonnaire d'utilisation des nutriments.

1. Sources et nature des nutriments et molécules actives disponibles pour l'embryon en développement

La durée du développement embryonnaire de l'oiseau varie en fonction de celle de la vie de l'oiseau car toutes deux correspondent à sa vitesse de croissance. Elle varie de 10 jours chez le Vacher (*Molothrus sp.*) à 80 jours chez l'Albatros royal. Les canards ont besoin de 28 à 36 jours (respectivement pour le Pekin et le Barbarie) ; les oies, de 30 à 35 jours et les poulets domestiques de 21 jours. Quand non précisé, l'espèce dont il sera question dans la suite du texte sera le poulet. Comme le poids d'abattage des animaux est atteint de plus en plus tôt (entre 35-42 jours), le développement embryonnaire représente 33 à 38 % de la vie d'un poulet de chair moderne. Quand on englobe la période d'incubation et la période périnatale (jusqu'à 4 jours après éclosion), l'ensemble représente plus de 50 % de la vie de l'animal (Druyan 2010). Chez les vertébrés ovipares (comme les oiseaux),

Encadré 2. ***L'œuf à couver et les annexes embryonnaires.***

La défense physique de l'embryon est assurée en premier lieu par la coquille, qui constitue une enveloppe protectrice. Formée de cristaux de carbonate de calcium, la coquille est poreuse. Elle permet ainsi les échanges gazeux mais induit des pertes en eau. Trois annexes permettent à l'embryon de se développer indépendamment de la mère. L'amnios délimite la cavité dans laquelle baigne l'embryon. Il isole l'embryon et le protège. Le sac vitellin, dont la paroi est très vascularisée, renferme les réserves vitellines (vitellus ou jaune). Le sac allantoïque sert de réservoir des déchets notamment azotés (acide urique) éliminés par l'embryon. Sa paroi vascularisée (membrane chorioallantoïque) constitue le site d'échanges respiratoires (*via* les pores de la coquille). En outre, des minéraux de la coquille peuvent être absorbés au niveau de ce sac allantoïque et transférés à l'embryon pour la calcification de son squelette. C'est également un organe de stockage pour de nombreux acides aminés libres et composés apparentés. Ces composés sont importants pour la nutrition de l'embryon pendant la phase d'incubation tardive (Schéma adapté de Da Silva, 2017).



le développement embryonnaire s'effectue totalement dans l'œuf, indépendamment de la mère. L'œuf constitue alors une enceinte close naturelle qui renferme tous les éléments nécessaires à la survie, au développement et à la protection d'un embryon lorsqu'il est incubé dans de bonnes conditions (température, humidité et retournement) (encadré 2). L'embryon utilise les nutriments de l'œuf sans possibilité d'élimination de déchets, puisque seuls les échanges gazeux se font avec le milieu extérieur.

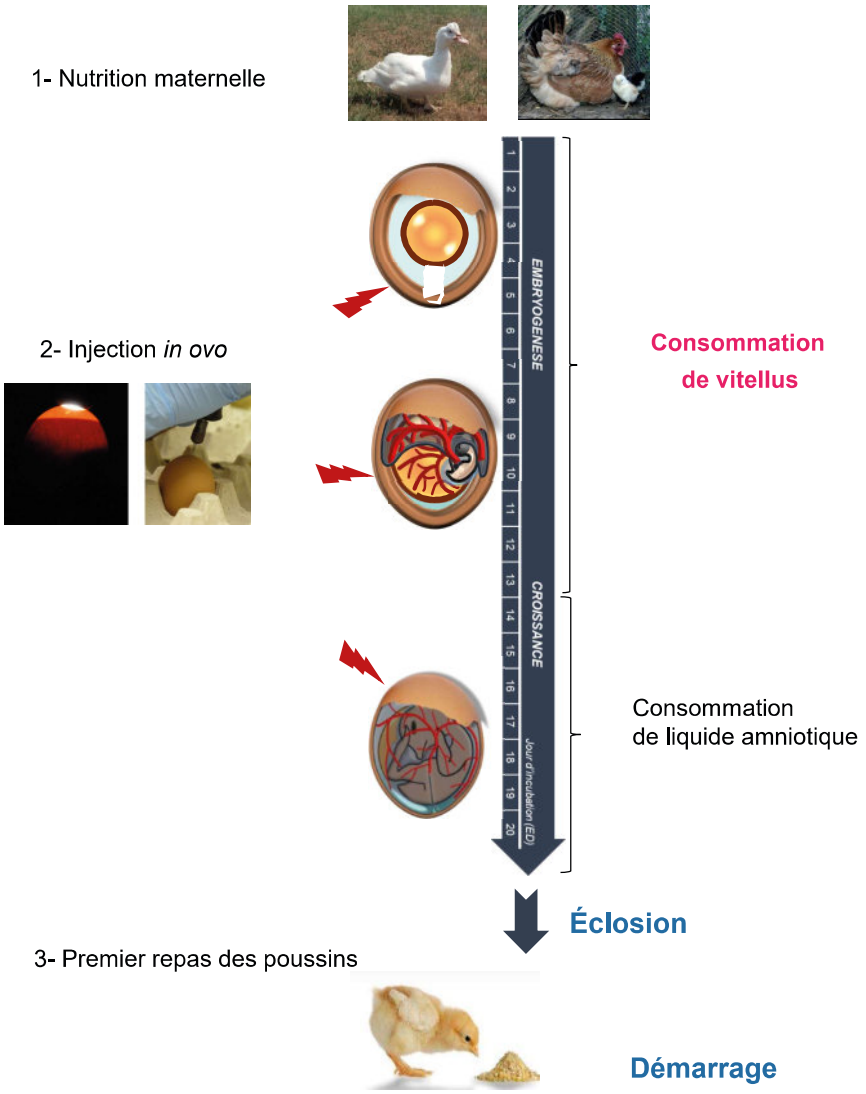
La principale source de nutriments de l'embryon pendant les deux premières semaines de son développement est le vitellus ou jaune, majoritairement composé de lipides et de protéines. La teneur en glucides de l'œuf est très limitée : sa concentration est inférieure à 1 % des nutriments totaux et le pourcentage de glucose libre n'est que de l'ordre de 0,3 % (Campos *et al.,* 2011). Dans le sac vitellin, à l'exception des immunoglobulines, l'essentiel des protéines, les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol sont synthétisés par le foie de la poule reproductrice. Les lipides et les protéines représentent respectivement 62,5 et 33 % de la matière sèche du jaune (Powrie *et al.,* 1986). Les lipides sont la principale source d'énergie pour l'embryon en développement (Moran, 2007 ; Cherian, 2015). L'ensemble des protéines du jaune d'œuf constitue aussi une réserve de nutriments. Outre leur valeur nutritive, de nombreuses protéines présentent aussi des activités biologiques propres, de transport et de stockage de vitamines (« *riboflavin-binding protein* », « *vitamin-D-binding protein* », avidine) ou d'ions métalliques (ovotransferrine, phosvitine), d'activités inhibitrices de lipases (apovitellenine), etc. (Bourin, 2011). Enfin, le jaune contient aussi des molécules liposolubles telles que les vitamines A, D, E et les caroténoïdes. Ces derniers proviennent exclusivement de l'alimentation maternelle. Des molécules possédant un potentiel antimicrobien sont également présentes dans le jaune d'œuf (Bourin *et al.,* 2011).

À partir de 14 jours de développement, l'embryon sera entouré d'une double enveloppe, l'amnios et l'allantoïde. Dans ce dernier tiers de développement pour la poule, l'embryon aura donc accès à d'autres nutriments présents dans ces deux annexes (riches en eau et en protéines). Après vingt jours, le poussin est dans sa position d'éclosion, le bec a percé la chambre à air, et la respiration pulmonaire a commencé. Après 21 jours d'incubation, le poussin sort finalement de sa coquille. L'allantoïde, qui lui a servi de poumons, sèche car le poussin utilise ses propres poumons. Lors de l'éclosion, l'amnios et l'allantoïde sont éliminés avec la coquille, l'albumen a été utilisé et le vitellus restant se rétracte dans l'abdomen de l'animal. Le poussin passe alors d'une alimentation principalement lipidique et protéique à une alimentation glucidique dès lors qu'il est transporté et mis en place chez l'éleveur avec accès à une alimentation riche en céréales.

2. Modifications de l'environnement de l'embryon *via* l'alimentation maternelle et conséquences sur l'élaboration des phénotypes de la descendance

Le développement de l'embryon dépend de l'environnement dans lequel il baigne et des nutriments disponibles. Une voie de modulation de la composition de l'œuf est la modification du régime alimentaire de la mère (Kidd *et al.,* 2005 ; Rao *et al.,* 2009) (figure 2). Cet environnement peut être modulé et influencer le développement physiologique et morphologique des embryons, avec pour conséquence des effets sur l'élaboration du phénotype des poussins (Ho *et al.,* 2011). Des liens entre la nutrition parentale, la composition de l'œuf et le comportement ultérieur des animaux (Aigueperse *et al.,* 2013), leurs performances (Bergoug *et al.,* 2013), et leur sensibilité aux maladies ont été établis. Les mécanismes sous-jacents à

Figure 2. ***Évènements nutritionnels précoces susceptibles de moduler la programmation métabolique et le phénotype des animaux (Adapté de Da Silva, 2017 et de Métayer-Coustard* et al.*, 2017).***



ces effets maternels ne sont pas toujours complètement décryptés ni compris.

■ 2.1. Modifications du phénotype de poussins suite à des pratiques d'élevage vécues par leur mère

En plus de la sévérité de la restriction alimentaire appliquée aux reproductrices, le moment et la durée de la restriction alimentaire pendant la période d'élevage sont des facteurs déterminants pour les performances de ponte ultérieures et l'élaboration du phénotype des descendants. Une restriction alimentaire avant le début de la maturité sexuelle, par exemple, peut affecter toute une gamme d'hormones circulantes comme les hormones thyroïdiennes ou les hormones somatotropes (Bruggeman *et al.,* 1999). Or, ces hormones influencent les performances ultérieures de la descendance.

Un déficit en protéines ou le jeûne modifient également le statut endocrinien des animaux *(* Scanes et Griminger, 1990 *)*. Des modifications hormonales dans l'œuf ont été mises en évidence dans le cadre de programmes de distribution de régimes à faible teneur en protéines (Rao *et al.,* 2009). Ce régime modifiait à la fois le taux de ponte et le poids des œufs mais aussi la quantité de leptine dans le jaune ainsi que l'expression d'un certain nombre de gènes exprimés au niveau du sac vitellin, de l'hypothalamus ou du muscle des descendants. Les poussins présentaient un poids plus faible à l'éclosion mais une croissance post-éclosion plus rapide. Plus récemment, il a été montré que des régimes jouant sur les teneurs en protéines, administrés à des femelles, impactaient négativement les performances de reproduction mais amélioraient les performances des descendants (Lesuisse *et al.,* 2017). Les auteurs ont également pu mettre en évidence des effets multigénérationnels de ce type de régime sur les performances des descendants (Lesuisse *et al.,* 2018a et 2018b ; Li *et al.,* 2018).

Des effets maternels ont aussi été décrits sur le développement et la composition corporelle de poussins issus de mères restreintes. Ces descendants, nourris *ad libitum,* présentaient une croissance moindre et une plus forte adiposité comparés à des animaux dont les mères étaient moins restreintes (van der Waaij *et al.,* 2011). Ce management a engendré des pertes économiques non négligeables du fait d'une réduction de la masse corporelle des animaux et d'une diminution de leur efficacité alimentaire. Spratt et Leeson (1987) ont aussi montré des différences de dépôt protéique et d'adiposité des carcasses sur des animaux issus de poules reproductrices nourries avec des régimes différant de par leur teneur en énergie et en protéines.

Outre leur valeur nutritionnelle, les régimes alimentaires des reproductrices peuvent avoir une signature olfactive que les embryons sont capables de capter. Les odeurs présentes lors de l'incubation, dès les premiers stades du développement du système olfactif lorsque les embryons n'ont pas encore adopté une respiration aérienne, peuvent alors influencer les futures préférences alimentaires des jeunes (Bertin *et al.,* 2012 ; Aigueperse *et al.,* 2013).

■ 2.2. Modifications de la composition de l'œuf et de l'environnement de l'embryon *via* l'alimentation maternelle

La composition de l'œuf est assez stable et l'alimentation de la poule n'affecte pas la composition des

constituants majeurs de l'œuf (lipides ou protéines). Cependant les teneurs en nutriments essentiels comme les acides gras, les vitamines, les oligo-éléments, les caroténoïdes ou certains acides aminés peuvent être modulées dans l'œuf *via* l'alimentation maternelle et induire des modifications des performances des descendants (pour revues, Kidd, 2003 ; Calini et Sirri, 2007 ; Rühl, 2007). Quelques exemples, non exhaustifs, sont détaillés ci-dessous.

a. Lipides et acides gras poly-insaturés

Les lipides sont les éléments nutritifs majeurs du jaune, disponibles pour l'embryon en développement. L'oxydation des acides gras couvre pratiquement toute la demande énergétique de l'embryon. Les acides gras sont donc essentiels pour le développement embryonnaire, la croissance de l'oiseau, le développement de son système nerveux central et de son système immunitaire (Noble *et al.,* 1984 ; Ding et Lilburn, 1996 ; Cherian, 2015). Chez la poule, Menge *et al.* (1974) a montré que des déplétions en acides gras essentiels provoquaient des éclosions plus tardives et que les descendants présentaient une croissance plus lente par rapport à un groupe contrôle.

La structure des lipoprotéines est stable mais l'équilibre des acides gras peut être modulé *via* l'alimentation maternelle. Les acides gras poly-insaturés (AGPI) vont varier en fonction de la source lipidique ajoutée dans l'aliment. Les acides gras n-6 (AG ω6) [linoléique (C18:2) ou arachidonique (C20:4)] sont principalement retrouvés dans des huiles de soja, tournesol ou carthame. La teneur en acide linoléique peut ainsi être multipliée par un facteur 2 à 2,5. Les acides gras n-3 (AG oméga 3 ou ω3) (linolénique : C18:3 ; eicosapentaénoïque (EPA) : C20:5 ; docosahexaénoïque (DHA) : C22:6) sont retrouvés dans les huiles de poisson, de lin, de millet, de colza ou encore dans les microalgues. Les teneurs en ω3 totaux peuvent être multipliées par 6 à 7 fois dans l'œuf. L'acide linolénique peut être augmenté d'un facteur 25 surtout avec l'huile de lin et le DHA par 10 avec de l'huile de poisson. Des variations de la composition et de l'équilibre en acides gras dans le jaune peuvent non seulement avoir des répercussions sur l'éclosabilité, la croissance et les performances des descendants (Koppenol *et al.,* 2015) mais aussi sur leur immunité passive (Wang *et al.,* 2004). Plusieurs études ont montré qu'une l'alimentation maternelle riche en oméga 3 présentait des propriétés olfactives qui étaient transmises à l'œuf (Leeson *et al.,* 1998 ; Gonzales-Esquerra et Leeson, 2000) et qui étaient perçues par les embryons. Ces odeurs représentent un outil intéressant pour réduire la néophobie alimentaire des descendants (Aigueperse *et al.,* 2013).

De nombreux travaux conduits chez l'homme et des modèles murins ont montré un effet positif des AG ω3 à longue chaîne (AG ω3 LC) sur le développement et le fonctionnement du cerveau. En élevage, les canards peuvent exprimer des comportements délétères tels que le nervosisme et le picage. L'enrichissement des œufs et donc des embryons en AG ω3 LC peut-être réalisé en alimentant les canes avec un régime contenant les acides docosahexaénoique (DHA) et linolénique (microalgues et huile de lin) (Baéza *et al.,* 2017). Ce régime ne modifie pas leurs performances de ponte et de reproduction et n'a pas d'effet sur le poids et la teneur en lipides des jaunes d'œufs. Par contre, les lipides des jaunes sont enrichis en AG ω3 et les canetons issus de canes alimentées avec un régime enrichi en AG ω3 ont un poids vif supérieur à J0, J28 et J56 et un indice de consommation, pour la période de croissance, inférieur. L'enrichissement en AG ω3 LC de l'aliment des canes réduit également la fréquence et la gravité du picage chez les canetons et réduit la durée d'immobilité tonique testée à l'âge de 19 jours. Une moindre hyperactivité et une moindre réactivité au stress des canetons issus de ces canes ont été observées.

b. Vitamines et minéraux

Des supplémentations minérales et en vitamines *via* l'alimentation maternelle ont souvent été étudiées pour résoudre les problèmes de minéralisation du squelette et les problèmes de pattes. Les avitaminoses, chez l'oiseau, se traduisent essentiellement par une diminution de la ponte et une chute du taux d'éclosion (Adrian, 1958). Une carence en vitamine A, double la fréquence des malpositions de l'embryon dans l'œuf (Polk et Sipe, 1940). Une déficience en vitamine E aura pour principale conséquence une désintégration des vaisseaux sanguins du blastoderme (Adamstone, 1931 ; Adamstone, 1941). Vers le quatrième jour de développement, il peut aussi se former un anneau dans le blastoderme qui interrompt ou inhibe la circulation vitelline et provoque la mort de l'embryon. Une réduction de la longueur du corps, des pattes et des ailes peut également être notée (Ferguson *et al.*, 1954). La vitamine D3 régule le flux de calcium à travers la membrane chorioallantoïque (CAM) selon un processus unidirectionnel et actif. Un régime déficient en vitamine D conduit à une diminution du transport de Ca^{++} à travers la CAM et à une diminution de l'accumulation de Ca^{++} dans l'embryon (rachitisme des jeunes, déformation des os), ainsi qu'à une augmentation de la mortalité embryonnaire tardive (mauvaise position, bec incapable de percer la coquille).

Les vitamines liposolubles (vitamine A, E ou D) comme les vitamines hydrosolubles (riboflavine, B12, thiamine, biotine, acide folique…) peuvent être enrichies dans l'œuf *via* l'alimentation des femelles. Les vitamines sont apportées sous forme de supplémentation dans l'alimentation selon des besoins calculés qui datent et qui ne correspondent plus forcément aux besoins des animaux actuels. La vitamine A est fabriquée par la poule grâce aux caroténoïdes trouvés dans l'alimentation. Les teneurs en caroténoïdes vont varier en fonction des sources végétales utilisées. Leur rendement de dépôt dans le jaune d'œuf est variable d'une source à l'autre. Ces caroténoïdes donneront la couleur au jaune d'œuf, couleur qui dépend de la quantité de caroténoïdes ingérés, de leur capacité colorante et de leur stabilité. Ils présenteront également un pouvoir anti-oxydant. La vitamine D n'est efficace que si l'alimentation contient suffisamment de calcium et de phosphore. Contrairement à la vitamine D3, la vitamine D2 n'est pas très utile pour l'oiseau (efficacité de moins de 10 % par rapport à la vitamine D3). La vitamine E, indispensable pour la fertilité

et le développement du cerveau, n'est efficace que si le sélénium est présent en quantité suffisante. Des minéraux tels que l'iode, le sélénium, le magnésium, le zinc, le cuivre ou le manganèse peuvent également être enrichis dans l'œuf (Surai et Parks, 2001 ; Jiakui et Xialong, 2004 ; Chinrasri *et al.,* 2013 ; Favero *et al.,* 2013 ; Saunders-Blades et Korver, 2015 ; Torres et Korver, 2018). Le sélénium peut être augmenté d'un facteur 5 à 10 et sa teneur sera supérieure dans le blanc d'œuf. Cet élément est essentiel dans la lutte antioxydante chez les oiseaux.

c. Acides aminés

Les besoins en acides aminés des reproductrices avaient historiquement été définis en mesurant la réponse des animaux en termes de production d'œufs. Devant l'évidence croissante des effets des acides aminés sur le phénotype des descendants, ces besoins sont actuellement ré-évalués. Des études testant différentes teneurs en lysine (Ciacciariello et Tyler, 2013) ou arginine digestibles (Muller Fernandes *et al.,* 2014) dans l'alimentation maternelle ont ainsi montré des effets positifs des supplémentations sur la descendance (ex : optimisation des performances, du rendement en carcasse, teneur en gras abdominal et qualité de l'os pour des supplémentations en arginine). Les mécanismes mis en jeu sont encore peu étudiés mais dans le cas de la méthionine, acide aminé essentiel pour l'oiseau, il a été conclu que le métabolisme des descendants avait été modifié en réponse aux régimes alimentaires des reproductrices. Brun *et al.* (2013) ; Brun *et al.* (2015) ont en effet montré qu'un régime restreint spécifiquement en méthionine distribué à des canes, modifiait le métabolisme hépatique de leur descendance et pouvait par conséquent induire des phénotypes différents chez les canetons. Un résultat marquant de cette étude était l'interaction significative entre l'alimentation maternelle et le sexe sur le poids de foie gras de la descendance. L'augmentation du poids de foie gras des mâles de l'ordre de 20 % dans cette étude pourrait être mise à profit pour réduire la durée du gavage et les coûts correspondant tout en répondant ainsi en partie à une attente sociétale qui vise à améliorer le bien-être des animaux en élevage.

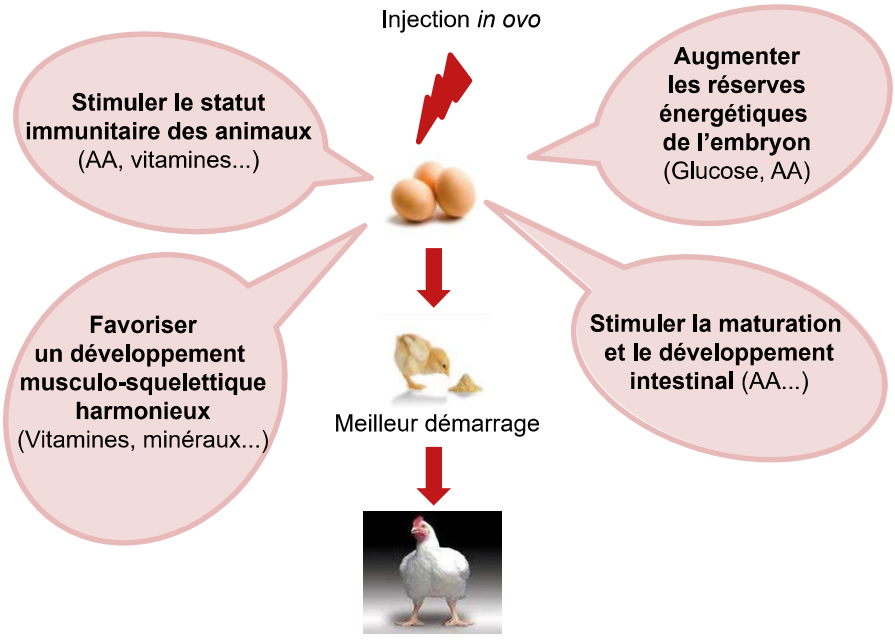
3. Supplémentation des œufs par injection *in ovo* (« in ovo *feeding* »)

■ 3.1. Généralités sur la nutrition *in ovo*

Si l'on considère que la formation et le développement des tissus (comme le muscle) ont lieu pendant les 21 jours de développement embryonnaire, qui représente rappelons-le 33 à 38 % de la vie totale de l'animal, il est probable qu'un désordre physiologique ou métabolique lors de ce développement précoce chez l'oiseau puisse significativement altérer le gain de poids post-éclosion et les caractéristiques de la carcasse (Velleman, 2007 ; Grodzik *et al.,* 2013). Le développement et la croissance rapides des souches d'oiseaux sélectionnées à l'heure actuelle peuvent faire que la quantité de nutriments dans l'œuf soit insuffisante pour un développement optimal des tissus (Grodzik *et al.,* 2013). Il faut donc agir au plus tôt sur la programmation métabolique des embryons pour optimiser leurs performances ultérieures. Des stratégies nutritionnelles innovantes telles que l'alimentation *in ovo* par injection de nutriments directement dans l'œuf ont été récemment développées pour assurer un approvisionnement en nutriments facilement disponibles afin de soutenir et accélérer la maturation du tube digestif, optimiser le développement et la croissance du poussin et donc obtenir des poussins de meilleure qualité (Kadam *et al.,* 2013 ; Roto *et al.,* 2016 ; Gao *et al.,* 2017 ; Ghanaatparast-Rashti *et al.,* 2018 ; Peebles, 2018) (figure 3). La supplémentation de l'œuf avec des composés de différentes natures vise donc à assurer un apport de nutriment supplémentaire pour que les poussins puissent faire face aux délais post-éclosion qui peuvent atteindre jusqu'à 48-72h et d'autre part à moduler des fonctions majeures. Ces stratégies nutritionnelles ont ainsi par exemple pour objectif de répondre à de nouveaux enjeux de la filière pour laquelle l'utilisation des antibiotiques est fortement dénoncée et les nouvelles pratiques visent à diminuer, voire supprimer leur utilisation dans les élevages ce qui conduit à des pertes de production et de profits pour les éleveurs (Castanon, 2007).

Le pourcentage d'éclosion et le poids des poussins dépendent de la substance injectée, du site et du moment d'injection des nutriments dans l'œuf. En tout début de développement, les composés sont injectés au plus près du disque

Figure 3. ***Les injections* in ovo *: lesquelles et pour quels effets ?***



germinal (Ebrahimi *et al.,* 2012). Plus tard, les nutriments, sont administrés dans le sac vitellin, qui présente une grande surface capable d'absorber des nutriments. Il semble cependant que même avec des éléments d'une totale innocuité, l'éclosion soit affectée lorsque les injections se font précocement dans les deux premières semaines de développement embryonnaire chez la poule. Après 17 jours d'incubation, quand le sac vitellin se résorbe, des injections sont réalisées dans la chambre à air ou dans l'amnios. Ces injections, plus tardives, ont souvent moins d'impacts néfastes sur l'éclosabilité et la mortalité embryonnaire. L'amnios est le site privilégié puisqu'en fin d'incubation les embryons ingèrent le liquide qui y est présent. Ces injections sont souvent réalisées au transfert des œufs de l'incubateur à l'éclosoir en même temps que les vaccinations *in ovo* (vers 18 jours d'incubation). Ces dernières, pratiquées en fin d'incubation permettent de vacciner précocement les animaux sans affecter leur survie ou leur éclosabilité (Breedlove *et al.,* 2011). La manipulation des animaux à l'éclosion est ainsi limitée et le stress engendré en période post-natale est minimisé. Ces pratiques sont plus rapides et permettent une plus grande uniformité dans la délivrance de la dose vaccinale ou de la solution nutritive. Les solutions de nutriments injectées en pratique sont souvent complexes.

L'oiseau étant ovipare, c'est un modèle idéal pour distinguer les effets directs des nutriments des effets maternels. En effet, l'alimentation maternelle peut influencer à la fois l'environnement dans lequel l'embryon se développe (principale source de nutriments pour l'oiseau) mais aussi la façon dont les gènes régulant le métabolisme sont exprimés *via* la transmission de marques épigénétiques maternelles (Frésard *et al.,* 2013). Ce modèle aviaire permet ainsi de comprendre et de maîtriser à la fois les effets directs (*via* des injections *in ovo*) et indirects (*via* la mère) de la nutrition sur la régulation du métabolisme et ses effets à long terme sur la croissance, la composition corporelle et l'élaboration du phénotype des descendants.

Des travaux récents ont montré qu'il était ainsi possible de modifier le métabolisme des animaux par des apports exogènes directement dans l'œuf de différentes substances dont les acides aminés, les substrats énergétiques, les solutions électrolytiques, les hormones, les nucléotides et les vitamines à des moments clés de l'embryogénèse par des injections *in ovo* (Gore et Qureshi, 1997 ; Henry et Burke, 1999 ; Ohta *et al.,* 1999 ; Kocamis *et al.,* 1999 et 2000 ; Tako *et al.,* 2004 ; Uni *et al.,* 2005 ; Kadam *et al.,* 2008 ; Zhai *et al.,* 2011c ; Mc Gruder *et al.,* 2011 ; Kornasio *et al.,* 2011 ; Bakyaraj *et al.,* 2012 ; Li *et al.,* 2016 ; Neves *et al.*, 2017 ; Gao *et al.,* 2017). Ces pratiques induisent des différences de performances des poussins à l'éclosion (poids, stock de glycogène, rendement en filet), qui peuvent être maintenues jusqu'à l'âge d'abattage. Cependant, les mécanismes d'orientation précoce du métabolisme à ces périodes restent largement méconnus.

■ 3.2. Enrichissement de l'œuf en substrats énergétiques

L'éclosion est chez l'oiseau une étape clé critique de sa vie. Ce processus très énergivore a des conséquences sur les taux d'éclosion, de morbidité et de mortalité et à plus long terme des conséquences sur la santé, la croissance et la qualité du produit final. À l'éclosion, les embryons utilisent préférentiellement le glucose plutôt que les acides gras pour leur production d'énergie. En effet, dans l'œuf la quantité d'oxygène étant limitée, pour une même quantité d'oxygène consommée, l'oxydation du glucose permet l'obtention de plus d'énergie qu'avec le catabolisme des lipides. En raison de la teneur limitée en glucides dans l'œuf, moins de 1 % de l'ensemble des nutriments disponibles totaux et seulement 0,3 % de glucose libre, le maintien de l'homéostasie du glucose pendant le développement embryonnaire tardif dépend de la quantité de glucose stocké sous forme de glycogène dans le foie et de glucose généré par la gluconéogenèse à partir des protéines (notamment musculaires) (Campos *et al.,* 2011). Le glycérol issu du métabolisme hépatique des triglycérides (provenant du jaune d'œuf) est le substrat majeur et indispensable pour la synthèse du glycogène dans le foie et le muscle à la fin de l'incubation (Sunny et Bequette, 2011). Entre 15 et 19 jours d'incubation, le foie est le lieu d'un métabolisme actif conduisant à un transfert de glucose et d'acides gras vers le muscle cervical (« *pipping muscle* », muscle sollicité lors du bêchage de la coquille pour la casser) progressivement enrichi en glucose, en glycogène et en protéines pour l'éclosion (Pulikanti *et al.,* 2010). Des niveaux faibles de glycogène hépatique sont associés à des éclosions plus tardives et longues et à une diminution du poids des poussins à l'éclosion. L'embryon doit mobiliser davantage ses protéines musculaires pour fournir des acides aminés orientés vers la gluconéogenèse, limitant ainsi sa croissance en fin d'éclosion et au cours de la première semaine de démarrage (Pearce, 1971). L'utilisation de protéines comme source d'énergie se fera au détriment du développement musculaire. En fin d'embryogenèse, le rendement en muscle pectoral diminue de façon significative (Guernec *et al.,* 2003). Une surexpression des gènes liés à l'atrophie tels que l'atrogine-1 et le MuRF1 observée à l'éclosion par rapport au jour 18 de l'embryogenèse pourrait expliquer partiellement cette fonte du muscle pectoral (Everaert *et al.,* 2013). Pour limiter l'utilisation des acides gras et la protéolyse des protéines musculaires à des fins énergétiques, des injections de carbohydrates seuls ou associés à d'autres nutriments d'intérêt ont été réalisées *in ovo* (Retes *et al.*, 2018).

La supplémentation *in ovo* a eu souvent pour objectif d'augmenter la quantité de sucres disponible dans l'œuf et ainsi d'épargner l'utilisation d'acides aminés pour la gluconéogenèse (Kornasio *et al.,* 2011). Retes *et al.* (2018) a pu ainsi démontrer dans une synthèse récente que les résultats étaient à la fois dépendants du type de sucre injecté, du site d'injection (vitellus, albumen, amnios, liquide allantoïque ou chambre à air), du stade de développement de l'embryon et de la génétique à laquelle les études s'intéressent. Uni *et al.* (2005), par exemple, ont montré que l'administration à 17,5 jours d'une solution contenant des hydrates de carbone (maltose, saccharose, dextrine) et un métabolite de la leucine (β-hydroxy-méthylbutyrate) augmentait le poids des poussins à

l'éclosion de 5 à 6 %, ainsi que les réserves de glycogène hépatique de 2 à 5 fois et rendement du muscle pectoral de 6 à 8 % par rapport à des poussins témoins dont les œufs n'ont pas été supplémentés. Ces performances améliorées étaient encore mesurables à 25 jours d'âge. Fournir des sucres comme source d'énergie par injection dans l'amnios, en fin d'incubation (17,5 j), peut aussi accélérer le développement intestinal en augmentant la taille des villosités et ainsi accroître la capacité de l'intestin à digérer les disaccharides (Tako *et al.,* 2004). Cette supplémentation peut avoir des effets trophiques sur l'intestin grêle et améliorer le développement des cellules caliciformes, sécrétrices de mucines (Smirnov *et al.,* 2006), ce qui explique certainement les poids plus élevés des animaux provenant d'œufs supplémentés. D'autres sucres, comme le fructose, ne sont pas recommandés car plusieurs études montrent une diminution d'éclosabilité des lots supplémentés en fructose ainsi qu'un poids plus petit des animaux (Zhai *et al.,* 2011).

D'autres supplémentations nutritionnelles (acides aminés : Li *et al.,* 2016 ; glycérol : Neves *et al.,* 2017 ; L-carnitine, créatine pyruvate : Zhao *et al.,* 2017) ont été injectées dans différents compartiments de l'œuf à différents stades de développement afin de modifier le métabolisme des embryons et le phénotype des animaux éclos (qualité et poids du poussin, composition corporelle, quantité de glycogène hépatique, rendement musculaire…). Les animaux sont parfois gardés au-delà de l'éclosion pour vérifier si les effets observés à l'éclosion restaient pérennes. Avec la supplémentation en créatine pyruvate à 12 mg par œuf, par exemple, le statut énergétique des animaux a été modifié. Cette supplémentation a conduit à des différences de poids des animaux et du *Pectoralis major* qui perdurent jusqu'à 21 jours d'âge (Zhao *et al.,* 2017).

■ 3.3. Enrichissement de l'œuf en acides aminés

Les œufs embryonnés contiennent tous les acides aminés nécessaires pour la croissance et le développement d'un embryon. Comme le rapporte Kucharska-Gaca *et al.* (2017), la composition en acides aminés d'un œuf a très peu changé au fil des ans alors que les besoins en nutriments des oiseaux au cours de leur développement embryonnaire ont changé. L'administration d'acides aminés *in ovo* peut fournir aux firmes avicoles une méthode alternative pour améliorer le poids des animaux à l'éclosion (Ohta *et al.,* 2001). Cette différence de poids à l'éclosion perdure dans certaines études jusque chez des animaux de 56 jours (Al-Murrani, 1982). L'administration d'acides aminés peut également induire une augmentation de la masse des organes lymphoïdes. D'autres stratégies consistent à administrer un seul acide aminé (thréonine, Kadam *et al.,* 2008 ; DL-méthionine, Coskun *et al.,* 2014). Certains acides aminés injectés, comme l'arginine ou la glutamine, servent pour la synthèse d'autres acides aminés. Ces supplémentations, outre leurs effets positifs sur le poids des animaux, diminuent le temps d'éclosion (Shafey *et al.,* 2014). L'apport d'acides aminés seul ou en association avec d'autres pourrait stimuler la synthèse protéique et l'accrétion protéique musculaire mais les mécanismes impliqués restent à comprendre. L'arginine, considérée comme un acide aminé essentiel chez les oiseaux, participe à la synthèse protéique. Elle peut aussi être convertie en glucose et être utilisée dans de nombreuses voies métaboliques qui produisent des composés actifs qui contribuent à maximiser le développement potentiel d'un embryon en stimulant la sécrétion d'hormone de croissance (Tong et Barbul, 2004). Les effets de l'arginine ont été confirmés chez d'autres oiseaux comme la caille ou le dindon (Foye *et al.,* 2007) avec d'autres effets démontrés comme une augmentation du nombre de poussins éclos, de leur poids à 7 et 42 jours, de leur gain de poids et de leur indice de consommation pour les cailles et une augmentation de l'activité des enzymes digestives (activités sucrose, maltose, leucine amino-peptidase) dans le tube digestif chez les dindons.

■ 3.4. Enrichissement des œufs en vitamines et oligo-éléments

L'efficacité des vitamines C, E, D3 et B9 (acide folique) sur la santé et le développement de l'embryon a été rapportée par plusieurs équipes dans la littérature (Peebles, 2018). Comme nous l'avons montré précédemment, l'embryon puise son énergie en grande partie en utilisant le vitellus. Cette utilisation est le résultat de processus oxydatifs qui produisent des radicaux libres qui conduisent entre autres à la dégradation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires. Les vitamines, telles que la vitamine E ou la vitamine C, limitent les effets négatifs des radicaux libres et protègent l'embryon (Surai *et al.,* 2016 ; Peebles, 2018 ; Araújo *et al.,* 2018). Selon les doses, les âges et les sites d'injection, les résultats rapportés peuvent être différents (augmentation de la capacité anti-oxydante, meilleure immunité, effet positif sur la croissance…).

L'administration de vitamines A, B1, B2, B6 ou E à 14 jours du développement embryonnaire peut contribuer positivement à la croissance des animaux (vitamines B1 et B2) et/ou moduler l'immunité et la robustesse des animaux (Goel *et al.,* 2013). Le poids relatif des bourses de Fabricius est ainsi plus élevé chez des animaux de 42 jours ayant reçu *in ovo* les vitamines B1, B2 et E et le poids du thymus est plus important dans le groupe ayant reçu les vitamines A, B6 et E. Le groupe ayant reçu de la vitamine B1 montre une meilleure réponse humorale. La vitamine E, quant à elle, ne va pas augmenter les performances des animaux mais va améliorer l'éclosabilité et stimuler le statut immunitaire post-éclosion des poussins (Salary *et al.,* 2014). L'injection de vitamine E va augmenter la résistance des poussins face à des maladies comme la grippe aviaire ou la bronchite infectieuse. Dans ce groupe expérimental, des niveaux plus élevés d'IgG, IgM et IgA ont pu être mis en évidence.

Pour stimuler la croissance et le développement de l'os ou sa minéralisation, des injections *in ovo* de vitamine D ont été pratiquées. La vitamine D est impliquée dans le métabolisme du calcium, et des recherches antérieures ont montré une meilleure résistance osseuse (minéralisation) avec des niveaux plus élevés de vitamine D dans l'alimentation. Cependant, l'injection *in ovo* de 25-hydroxycholecalciferol au jour 18

de l'embryogenèse en prévision d'une minéralisation osseuse plus élevée à l'éclosion et à 21 jours de vie n'affecte pas toujours la qualité osseuse des animaux à l'éclosion (peut-être parce que le poussin n'a pas pu trouver le calcium et les minéraux supplémentaires du fait de la composition contrainte de l'œuf ou que l'injection a été faite trop tardivement par rapport au développement du poussin) (Bello *et al.,* 2014). La combinaison de vitamine D3 et de minéraux injectés plus tôt (E17) semble avoir des effets positifs sur les propriétés des os des poussins éclos et des poulets plus âgés (Yair *et al.,* 2015). Si certaines vitamines peuvent sembler sans effet sous certaines formes, d'autres peuvent se révéler toxiques. Ainsi, la vitamine D3 peut induire une calcification des os mous, et compromettre l'éclosion et augmenter la mort embryonnaire. Supplémenté sous la forme 25-hydroxycholecalciferol, biologiquement plus actif que la vitamine D3, plus stable et moins toxique que le 1,25-dihydrocholecalciferol (Soares *et al.,* 1995), elle ne présente pas d'effet délétère sur l'embryogénèse, le développement du squelette et l'éclosabilité des poussins (Bello *et al.,* 2013).

Des supplémentations de l'œuf en sélénium, élément essentiel dans la lutte antioxydante chez les oiseaux, ont été testées sur l'efficacité de la protection des poussins contre l'entérite nécrotique (Lee *et al.,* 2014). Un effet protecteur global chez le poulet contre l'entérite nécrotique expérimentale a été mis en évidence dans cette étude. Le sélénium aurait cet effet en contrôlant l'activation des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes B.

4. Comment les nutriments peuvent contribuer à la programmation métabolique des animaux et à l'élaboration de leur phénotype

Déterminer les mécanismes par lesquels les nutriments des œufs régulent le métabolisme cellulaire, la signalisation, l'expression des gènes et la fonction est essentiel pour améliorer l'utilisation des nutriments, l'efficacité des productions avicoles et la robustesse des animaux. Peu de mécanismes ont été décryptés à ce jour chez les oiseaux. Les études, non exhaustives référencées, n'abordent souvent pas l'étude des mécanismes impliqués dans la reprogrammation métabolique des embryons. Il pourrait s'agir de régulations métaboliques similaires à celles qui ont été décrites aux périodes d'élevage plus tardives. L'importance de certains acides aminés (lysine, méthionine) n'est plus à démontrer pour la régulation des métabolismes protéique et énergétique d'animaux en croissance, avec des effets marqués sur la croissance du poulet et la qualité des produits (Berri *et al.,* 2008 ; Métayer *et al.,* 2008 ; Tesseraud *et al.,* 2009). Une telle régulation par les acides aminés utilisés comme substrats ou en tant que nutriments-signal permet de moduler le métabolisme protéino-énergétique (Tesseraud *et al.,* 2003 ; Métayer-Coustard *et al.,* 2010). Par ailleurs, des modifications de type épigénétique, c'est-à-dire des changements transmissibles et réversibles de l'expression des gènes, sans altération de la séquence d'ADN, pourraient également être impliquées, notamment lorsque sont injectées des molécules donneuses de groupements méthyles comme la méthionine ou d'autres micronutriments (Anderson *et al.,* 2012 ; Donohoe et Bultman, 2012 ; Veron *et al.,* 2018).

Chez les mammifères, plus de données sont disponibles. Une malnutrition maternelle entraîne un faible poids à la naissance de la progéniture. L'abondance alimentaire subséquente dans son environnement entraîne un phénomène de croissance compensatoire (Fagerberg *et al.,* 2004). La nutrition maternelle pendant la gestation modifie l'expression génique de la progéniture par des altérations épigénétiques comme les modifications de l'ADN et des histones (Simmons, 2011). L'épigénome est particulièrement dynamique au cours de l'embryogenèse et la méthylation de l'ADN nécessaire au développement normal des tissus est établie au cours du développement précoce. La méthylation de l'ADN est un important facteur épigénétique pour le maintien du silence génétique qui repose sur l'apport de groupements méthyles. Les histones sont également influencées par de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, ADP-ribosylation, sumoylation, glycosylation). Les substrats et cofacteurs impliqués dans l'apport de groupements méthyles sont considérés comme particulièrement importants au cours des premiers stades de développement (Sinclair *et al.,* 2007b). Ainsi, la manipulation de la teneur en acides aminés soufrés de l'alimentation précoce peut induire des changements dans les fonctions cellulaires qui ont des répercussions pour le développement de l'animal, sa croissance à long terme et sa santé. Les acides aminés soufrés (Met) comme d'autres acides aminés (Gly, His, Ser), les vitamines (B6, B12 et folate) ou les micronutriments (bétaïne et choline) jouent un rôle clé dans la fourniture de donneurs de méthyles pour l'ADN et modifications d'histones (Anderson *et al.,* 2012).

Dans diverses espèces, les régimes alimentaires sous-optimaux en acide folique, choline, méthionine et/ou la vitamine B12 et déficients en groupements méthyles distribués autour de la conception programment l'axe insulinique et augmentent le métabolisme glucidique des descendants. Altmann *et al.* (2012) ; Altmann *et al.* (2013) a montré que la restriction comme l'excès de protéines pendant la gestation chez le porc pouvait modifier l'expression de gènes clés impliqués dans le métabolisme de la méthionine au niveau du foie et du muscle des descendants. Ces gènes sont importants pour la condensation des chromosomes et la méthylation globale de l'ADN. Chez le rat, un régime déficient en groupements methyles modifie le protéome hépatique des descendants à l'âge adulte (Maloney *et al.,* 2013). Pour ces raisons, la supplémentation nutritionnelle, notamment de micronutriments, est en plein développement chez les oiseaux pour essayer de programmer précocement le métabolisme des animaux et leur permettre ainsi une utilisation meilleure ou différente des nutriments mis à leur disposition.

Conclusion

La manipulation très précoce de l'environnement dans lequel l'embryon se développe est très prometteur pour analyser l'influence des conditions précoces sur l'élaboration des phénotypes à long terme que ce soit sur des critère de croissance, composition corporelle, caractéristiques tissulaires, robustesse vis-à-vis de challenges ou adaptation à des conditions d'élevage différentes. Ces approches visent à augmenter l'efficience et la qualité de la production (poussin, viande) ainsi que l'adaptabilité des animaux à différents environnements. Outre les bienfaits sur le développement, la santé et le bien-être des animaux, ces stratégies alimentaires peuvent répondre à des intérêts environnementaux et économiques.

Les études de transmission trans-générationnelle sont encore anecdotiques dans la littérature chez l'oiseau et restent à développer. Un nouveau champ d'investigation s'ouvre également sur les effets des régimes alimentaires des pères et les répercussions sur l'élaboration des phénotypes de leurs descendants. Chez les mammifères, il a été récemment montré des changements épigénétiques de la descendance en fonction du régime alimentaire des reproducteurs mâles (par exemple chez la souris). Qu'en est-il chez les Oiseaux ?

La porte est ainsi largement ouverte pour l'avenir pour programmer ou réorienter précocement le métabolisme des embryons. Il n'en demeure pas moins des questions d'actualité. Ces stratégies alimentaires sont-elles en adéquation avec l'attente sociétale ? L'intervention sur les régimes alimentaires des reproductrices peut paraître plus applicable et acceptable éthiquement qu'une injection dans l'œuf. Toutefois, lorsque des reproductrices sont autant restreintes, quelle assurance avons-nous que les éléments enrichis dans l'alimentation ne seront pas détournés à leur propre profit ? N'omettons pas une troisième possibilité pour moduler et réorienter le métabolisme des animaux précocement, la nutrition et le management des animaux au cours de la première semaine de vie, période pendant laquelle les animaux présentent encore une certaine plasticité métabolique. Quelle que ce soit l'approche employée, nutrition maternelle, nutrition *in ovo* ou nutrition précoce, il reste essentiel de ne pas se restreindre à des seuls critères de rentabilité favorisant toujours des animaux plus lourds obtenus plus rapidement. Outre la nutrition précoce, d'autres stratégies autour de l'incubation des œufs (influence de la température, de l'intensité lumineuse…) sont envisageables et influencent le métabolisme des embryons et les performances ultérieures des animaux.

Références

Adamstone F.B., 1931. The effects of vitamin E deficiency on the development of the chick. J. morphol., 52, 47-80.

Adamstone F.B., 1941. Erythrophagocytosis in chicks reared on a vitamin E-deficient ration supplemented with halibut liver oil. Arch. Pathol., 31, 622-626.

Adrian J., 1958. Répercussions des avitaminoses sur le développement embryonnaire chez le mammifère et l'oiseau. Ann. Zootech., INRA/EDP Sciences, 7, 97-122.

Aigueperse N., Calandreau L., Bertin A., 2013. Maternal diet influences offspring feeding behavior and fearfulness in the precocial chicken. PLoS One, 8, e77583.

Al-Murrani W.K., 1982. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. Br. Poult. Sci., 23, 171-174.

Altmann S., Murani E., Schwerin M., Metges C.C., Wimmers K., Ponsuksili S., 2012. Maternal dietary protein restriction and excess affects offspring gene expression and methylation of non-SMC subunits of condensin I in liver and skeletal muscle. Epigenetics, 7, 239-252.

Altmann S., Murani E., Schwerin M., Metges C.C., Wimmers K., Ponsuksili S., 2013. Dietary protein restriction and excess of pregnant German Landrace sows induce changes in hepatic gene expression and promoter methylation of key metabolic genes in the offspring. J. Nutr. Biochem., 24, 484-495.

Anderson O.S., Sant K.E., Dolinoy D.C., 2012. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. J. Nutr. Biochem., 23, 853-859.

Araújo I.C.S., Café M.B., Noleto R.A., Martins J.M.S., Ulhoa C.J., Guareshi G.C., Reis M.M., Leandro N.S.M., 2018. Effect of vitamin E *in ovo* feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. Poult Sci., 0, 1-10.

Arnould C., Michel V., Le Bihan-Duval E., 2011. Sélection génétique et bien-être des poulets de chair et des reproducteurs. In : Bien-être du poulet de chair. Bouvarel I. (Ed). Dossier, INRA Prod. Anim., 24, 165-170.

Baéza E., Chartrin P., Bordeau T., Lessire M., Thoby J.M., Gigaud V., Blanchet M., Alinier A., Leterrier C., 2017. Omega-3 polyunsaturated fatty acids provided during embryonic development improve the growth performance and welfare of Muscovy ducks (Cairina moschata). Poult. Sci., 96, 3176-3187.

Bakyaraj S., Bhanja S.K., Majumdar S., Dash B., 2012. Modulation of post-hatch growth and immunity through in ovo supplemented nutrients in broiler chickens. J. Sci. Food Agric., 92, 313-320.

Bello A., Zhai W., Gerard P.D., Peebles E.D., 2013. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. Poult. Sci., 92, 2551-2559.

Bello A., Bricka R.M., Gerard P.D., Peebles E.D., 2014. Effects of commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler bone development and mineralization on days 0 and 21 posthatch. Poult. Sci., 93, 1053-1058.

Bergoug H., Guinebretière M., Tong Q., Roulston N., Romanini C.E., Exadaktylos V., Berckmans D., Garain P., Demmers T.G., McGonnell I.M., Bahr C., Burel C., Eterradossi N., Michel V., 2013. Effect of transportation duration of 1-day-old chicks on postplacement production performances and pododermatitis of broilers up to slaughter age. Poult. Sci., 92, 3300-3309.

Berri C., Besnard J., Relandeau C., 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases drip loss of broiler breast meat. Poult. Sci., 87, 480-484.

Bertin A., Calandreau L., Arnould C., Lévy F., 2012. The developmental stage of chicken embryos modulates the impact of in ovo olfactory stimulation on food preferences. Chem. Senses, 37, 253-261.

Bigot K., Mignon-Grasteau S., Picard M., Tesseraud S., 2003. Effects of delayed feed intake on body, intestine, and muscle development in neonate broilers. Poult. Sci., 82, 781-788.

Bourin M.C., 2011. In : Caractérisation fonctionnelle et biochimique des protéases et antiprotéases présentes dans le jaune d'œuf Gallus gallus. Thèse soutenue en décembre 2011 à l'Université François Rabelais de Tours, France.

Bourin M., Gautron J., Berges M., Attucci S., Le Blay G., Labas V., Nys Y., Rehault-Godbert S., 2011. Antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor of chicken egg. J. Agric. Food Chem., 59, 12368-12374.

Breedlove C., Minc J.K., Tang D.C., van Santen V.L., van Ginkel F.W., Toro H., 2011. Avian influenza adenovirus-vectored in ovo vaccination: target embryo

tissues and combination with Marek's disease vaccine. Avian Dis., 55, 667-673.

Bruggeman V., Onagbesan O., D'Hondt E., Buys N., Safi M., Vanmontfort D., Berghman L., Vandesande F., Decuypere E., 1999. Effects of timing and duration of feed restriction during rearing on reproductive characteristics in broiler breeder females. Poult. Sci., 78, 1424-1434.

Brun J.M., Basso B., Bernadet M.D., Cornuez A., Leroux S., Lessire M., Sellier N., Pitel F., Morisson M., 2013. Influence du taux de méthionine dans l'aliment de la cane commune sur les performances de gavage de ses descendants mulards : une question de programmation métabolique précoce et d'épigénétique ? In : Journ. Rech. Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, 10, 215.

Brun J.M., Bernadet M.D., Cornuez A., Leroux S., Bodin L., Basso B., Davail S., Jaglin M., Lessire M., Martin X., Sellier N., Morisson M., Pitel F., 2015. Influence of grand-mother diet on offspring performances through the male line in Muscovy duck. BMC Genet., 16, 145.

Calini F., Sirri F., 2007. Breeder Nutrition and Offspring Performance. Brazilian J. Poult. Sci., 9, 77-83.

Castanon J.I.R., 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European Poultry Feeds. Poult. Sci., 11, 2466-2471.

Cherian G., 2015. Nutrition and metabolism in poultry: role of lipids in early diet. J. Anim. Sci. Biotechnol., 6, 28.

Chinrasri O., Chantiratikul P., Maneetong S., Chookhampaeng S., Chantiratikul A., 2013. Productivity and selenium concentrations in egg and tissue of laying quails fed selenium from hydroponically produced selenium-enriched kale sprout (*Brassica oleracea var. alboglabra L.*). Biol. Trace Elem. Res., 155, 381-386.

Ciacciariello M., Tyler N.C., 2013. The effects of maternal dietary lysine intake on offspring performance to 21 days of age. J. Appl. Poult. Res., 22, 238-244.

Coşkun I., Erener G., Şahin A., Ufuk Karadavut U., Altop A., Okur A.A., 2014. Impacts of In Ovo Feeding of DL-Methionine on Hatchability and Chick Weight. Turkish J. Agric. - Food Sci. Technol., 2, 47-50.

DaSilva M., 2017. Les liquides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule : caractérisation et rôle dans la protection de l'embryon au cours de l'incubation ». Thèse de l'université de Tours, soutenue en décembre 2017.

Decuypere E., Bruggeman V., Barbato G.F., Buyse J., 2003. Growth an reproduction problems associated with selection for increased broiler meat production. In: Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology. Muir W., Aggrey S.E. (Ed). Cabi Publishing, Wallingford, U.K., 13-28. http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Animal-Agriculture/Poultry-Genetics-Breeding-and-Biotechnology.pdf

Decuypere E., Hocking P.M., Tona K., Onagbesan O., Bruggeman V., Jones E.K.M., Cassy S., Rideau N., Metayer S., Jego Y., Putterflam J., Tesseraud S., Collin A., Duclos M., Trevidy J.J., Williams J., 2006. Broiler breeder paradox: a project report. World's Poult. Sci. J., 62, 443-453.

Decuypere E., Bruggeman V., Everaert N., Li Y., Boonen R., De Tavernier J., Janssens S., Buys N., 2010. The broiler breeder paradox: ethical, genetic and physiological perspectives, and suggestions for solutions. Br. Poult. Sci., 51, 569-579.

De Jong I.C., Guemene D., 2011. Major welfare issues in broiler breeders. World's Poult. Sci. Journal, 67, 73-81.

Ding S.T., Lilburn M.S., 1996. Characterization of changes in yolk sac and liver lipids during embryonic and early posthatch development of turkey poults. Poult. Sci., 75, 478-483.

Donohoe D.R., Bultman S.J., 2012. Metaboloepigenetics: interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. J. Cell. Physiol., 227, 3169-3177.

Druyan S., 2010. The effects of genetic line (broilers vs. layers) on embryo development. Poult Sci., 89, 1457-1467.

Ebrahimi M.R., Jafari Ahangari Y., Zamiri M.J., Akhlaghi A., Atashi H., 2012. Does preincubational in ovo injection of buffers or antioxidants improve the quality and hatchability in long-term stored eggs? Poult. Sci., 91, 2970-2976.

Emmerson D.A., 1997. Commercial approaches to genetic selection for growth and feed conversion in domestic poultry. Poult. Sci., 76, 1121-1125.

Everaert N., Métayer-Coustard S., Willemsen H., Han H., Song Z., Ansari Z., Decuypere E., Buyse J., Tesseraud S., 2013. The effect of albumen removal before incubation (embryonic protein under-nutrition) on the post-hatch performance, regulators of protein translation activation and proteolysis in neonatal broilers. Br. J. Nutr., 110, 265-274.

Fagerberg B., Bondjers L., Nilsson P., 2004. Low birth weight in combination with catch-up growth predicts the occurrence of the metabolic syndrome in men at late middle age: the Atherosclerosis and Insulin Resistance study. J. Intern. Med., 256, 254-259.

Favero A., Vieira S.L., Angel C.R., Bos-Mikich A., Lothhammer N., Taschetto D., Cruz R.F., Ward T.L., 2013. Development of bone in chick embryos from Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. Poult. Sci., 92, 402-411.

Ferguson T.M., Couch J.R., 1954. Further gross observations on the B12-deficient chick embryo. J. Nutr., 54, 361-370.

Foye O.T., Ferket P.R., Uni Z., 2007. The effects of in ovo feeding arginine, beta-hydroxy-beta-methyl-butyrate, and protein on jejunal digestive and absorptive activity in embryonic and neonatal turkey poults. Poult. Sci., 86, 2343-2349.

Frésard L., Morisson M., Brun J.M., Collin A., Pain B., Minvielle F., Pitel F., 2013. Epigenetics and phenotypic variability: some interesting insights from birds. Genet. Sel. Evol., 45, 16.

Gao T., Zhao M., Zhang L., Li J., Yu L., Lv P., Gao F., Zhou G., 2017. Effect of in ovo feeding of l-arginine on the hatchability, growth performance, gastrointestinal hormones, and jejunal digestive and absorptive capacity of posthatch broilers. J. Anim. Sci., 95, 3079-3092.

Ghanaatparast-Rashti M., Mottaghitalab M., Ahmadi H., 2018. In ovo feeding of nutrients and its impact on post-hatching water and feed deprivation up to 48 hr, energy status and jejunal morphology of chicks using response surface models. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl), 102, e806-e817.

Goel A., Bhanja S.K., Pande V., Mehra M., Mandal A., 2013. Effects of in ovo administration of vitamins on post hatch-growth, immunocompetence and blood biochemical profiles of broiler chickens. Indian J. Anim. Sci., 83, 916-921.

Gonzalez-Esquerra R., Leeson S., 2000. Studies on the metabolizable energy content of ground full-fat flaxseed fed in mash, pellet, and crumbled diets assayed with birds of different ages. Poult. Sci., 79, 1603-1607.

Gore A.B., Qureshi M.A., 1997. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. Poult. Sci., 76, 984-991.

Grodzik M., Sawosz F., Sawosz E., Hotowy A., Wierzbicki M., Kutwin M., Jaworski S., Chwalibog A., 2013. Nanonutrition of chicken embryos. The effect of in ovo administration of diamond nanoparticles and L-glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles.Int. J. Mol. Sci., 14, 23033-23044.

Guernec A., Berri C., Chevalier B., Wacrenier-Cere N., Le Bihan-Duval E., Duclos M.J., 2003. Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. Growth Horm. IGF Res., 13, 8-18.

Havenstein G.B., Ferket P.R., Qureshi M.A., 2003. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. Poult. Sci., 82, 1500-1508.

Henry M.H., Burke W.H., 1999. The effects of in ovo administration of testosterone or an antiandrogen on growth of chick embryos and embryonic muscle characteristics. Poult. Sci., 78, 1006-1013.

Ho D.H., Reed W.L., Burggren W.W., 2011. Egg yolk environment differentially influences physiological and morphological development of broiler and layer chicken embryos. J. Exp. Biol., 214, 619-628.

Hocking P.M., 2010. Developments in poultry genetic research 1960-2009. Br. Poult. Sci., 51 Suppl 1, 44-51.

Jiakui L., Xiaolong W., 2004. Effect of dietary organic versus inorganic selenium in laying hens on the productivity, selenium distribution in egg and selenium content in blood, liver and kidney. J. Trace Elem. Med. Biol., 18, 65-68.

Kadam M.M., Bhanja S.K., Mandal A.B., Thakur R., Vasan P., Bhattacharyya A., Tyagi J.S., 2008. Effect of

in ovo threonine supplementation on early growth, immunological responses and digestive enzyme activities in broiler chickens. Br. Poult. Sci., 49, 736-741.

Kadam M.M., Barekatain M.R., Bhanja S.K., Iji P.A., 2013. Prospects of in ovo feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications--a review. J. Sci. Food Agric., 93, 3654-3661.

Kidd M.T., 2003. A treatise on chicken dam nutrition that impacts on progeny. World Poult. Sci. J., 59, 475-494.

Kidd M.T., 2004. Nutritional modulation of immune function in broilers. Poult Sci., 83, 650-657.

Kidd M.T., McDaniel C.D., Peebles E.D., Barber S.J., Corzo A., Branton S.L., Woodworth J.C., 2005. Breeder hen dietary L-carnitine affects progeny carcase traits. Br. Poult. Sci., 46, 97-103.

Kocamis H., Yeni Y.N., Kirkpatrick-Keller D.C., Killefer J., 1999. Postnatal growth of broilers in response to in ovo administration of chicken growth hormone. Poult. Sci., 78, 1219-1226.

Kocamis H., Yeni Y.N., Brown C.U., Kenney P.B., Kirkpatrick-Keller D.C., Killefer J., 2000. Effect of in ovo administration of insulin-like growth factor-I on composition and mechanical properties of chicken bone. Poult. Sci., 79, 1345-1350.

Koppenol A., Buyse J., Everaert N., Willems E., Wang Y., Franssens L., Delezie E., 2015. Transition of maternal dietary n-3 fatty acids from the yolk to the liver of broiler breeder progeny via the residual yolk sac. Poult. Sci. 94, 43-52.

Kornasio R., Halevy O., Kedar O., Uni Z., 2011. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. Poult. Sci., 90, 1467-1477.

Kucharska-Gaca J., Kowalska E., Dębowska M., 2017. In ovo feeding – technology of the future – a review. Annals Anim. Sci., https://doi.org/10.1515/aoas-2017-0004

Lee S.H., Lillehoj H.S., Jang S.I., Jeong M.S., Xu S.Z., Kim J.B., Park H.J., Kim H.R., Lillehoj E.P., Bravo D.M., 2014. Effects of in ovo injection with selenium on immune and antioxidant responses during experimental necrotic enteritis in broiler chickens. Poult. Sci., 93, 1113-1121.

Leeson S., Caston L., MacLaurin T., 1998. Organoleptic evaluation of eggs produced by laying hens fed diets containing graded levels of flaxseed and vitamin E. Poult. Sci., 77, 1436-1440.

Lesuisse J., Li C., Schallier S., Leblois J., Everaert N., Buyse J., 2017. Feeding broiler breeders a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period impairs reproductive performance but enhances broiler offspring performance. Poult Sci., 96, 3949-3959.

Lesuisse J., Li C., Schallier S., Clímaco W.L.S., Bautil A., Everaert N., Buyse J., 2018. Multigenerational effects of a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period of broiler breeders. 1. Performance of the F1 breeder generation. Poult Sci., 97, 1651-1665.

Lesuisse J., Schallier S., Li C., Bautil A., Li B., Leblois J., Buyse J., Everaert N., 2018. Multigenerational effects of a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period of broiler breeders. 2. Zootechnical performance of the F1 broiler offspring. Poult Sci., 97, 1666-1676.

Li Y., Wang Y., Willems E., Willemsen H., Franssens L., Buyse J., Decuypere E., Everaert N., 2016. In ovo L-arginine supplementation stimulates myoblast differentiation but negatively affects muscle development of broiler chicken after hatching. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl), 100, 167-177.

Li C., Lesuisse J., Schallier S., Clímaco W., Wang Y., Bautil A., Everaert N., Buyse J., 2018. The effects of a reduced balanced protein diet on litter moisture, pododermatitis and feather condition of female broiler breeders over three generations. Animal, 12, 1493-1500.

Maloney C.A., Hay S.M., Reid M.D., Duncan G., Nicol F., Sinclair K.D., Rees W.D., 2013. A methyl-deficient diet fed to rats during the pre- and peri-conception periods of development modifies the hepatic proteome in the adult offspring. Genes Nutr., 8, 181-190.

McGruder B.M., Zhai W., Keralapurath M.M., Bennett L.W., Gerard P.D., Peebles E.D., 2011. Effects of in ovo injection of electrolyte solutions on the pre- and post-hatch physiological characteristics of broilers. Poult. Sci., 90, 1058-1066.

Menge H., Littlefield L.H., Frobish L.T., Weinland B.T., 1974. Effect of cellulose and cholesterol on blood and yolk lipids and reproductive efficiency of the hen. J. Nutr., 104, 1554-1566.

Métayer S., Seiliez I., Collin A., Duchêne S., Mercier Y., Geraert P.A., Tesseraud S., 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. J. Nutr. Biochem., 19, 207-215.

Métayer-Coustard S., Mameri H., Seiliez I., Crochet S., Crépieux P., Mercier Y., Geraert P.A., Tesseraud S., 2010. Methionine deprivation regulates the S6K1 pathway and protein synthesis in avian QM7 myoblasts without activating the GCN2/eIF2 alpha cascade. J. Nutr., 140, 1539-1545.

Métayer-Coustard S., Lesuisse J., Schallier S., Roffidal L., Buyse J., 2017. Alimentation maternelle et nutrition in ovo, de nouvelles stratégies alimentaires précoces au service de la production avicole. Journ. Rech. Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, 12, 67-77.

Moran E.T. Jr., 2007. Nutrition of the developing embryo and hatchling. Poult. Sci., 86, 1043-1049.

Moss F.P., 1968. The relationship between the dimension of the fibres and the number of nuclei during normalgrowth of skeletal muscle in the domestic fowl. Am. J. Anat., 122, 555-564.

Müller Fernandes J.I., Murakami A.E., Gomes de Souza L.M., Ospina-Rojas I.C., Rossi R.M.., 2014. Effect of arginine supplementation of broiler breeder hens on progeny performance. Can. J. Anim. Sci., 94, 313-321.

Neves D.G., Retes P.L., Rocha R.R., Ferreira L.G., Naves L.P., Alvarenga R.R., Fassani E.J., Pereira L.J., Sousa R.V., Zangeronimo M.G., 2017. Effects of in ovo feeding with glycerol for broilers. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 101, 434-440.

Noble R.C., Connor K., Smith W.K., 1984. The synthesis and accumulation of cholesteryl esters by the developing embryo of the domestic fowl. Poult. Sci., 63, 558-564.

Ohta Y., Tsushima N., Koide K., Kidd M.T., Ishibashi T., 1999. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. Poult. Sci., 78, 1493-1498.

Ohta Y., Kidd M.T., Ishibashi T., 2001. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after in ovo administration of amino acids. Poult. Sci., 80, 1430-1436.

Pearce J., 1971. Carbohydrate metabolism in the domestic fowl. Proc Nutr Soc., 30, 254-259. Review.

Peebles E.D., 2018. In ovo applications in poultry: A review. Poult. Sci., 97, 2322-2338.

Polk H.D., Sipe G.R., 1940. The Effect of Vitamin A Deficiency on Malposition of the Chick Embryo. Poult. Sci., 19, 396-400.

Powrie W.D., Nakaï S., 1986. The chemistry of eggs and egg products. In: Stadelman W.J., Cotterill O.J. (Eds). Egg science and technology. Avi Publishing, Westport, CT, 97-139.

Pulikanti R., Peebles E.D., Keirs R.W., Bennett L.W., Keralapurath M.M., Gerard P.D., 2010. Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation. Poult. Sci., 89, 860-865.

Rao K., Xie J., Yang X., Chen L., Grossmann R., Zhao R., 2009. Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. Br. J. Nutr., 102, 848-857.

Retes P.L., Clemente A.H.S., Neves D.G., Espósito M., Makiyama L., Alvarenga R.R., Pereira L.J., Zangeronimo M.G., 2018. In ovo feeding of carbohydrates for broilers-a systematic review. J. Anim. Physiol. Anim. (Berl).102, 361-369. Review.

Roto S.M., Kwon Y.M., Ricke S.C., 2016. Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. Front. Vet. Sci., 3, 63. Review.

Rühl R., 2007. Effects of dietary retinoids and carotenoids on immune development. Proc. Nutr. Soc., 66, 458-469.

Salary J., Sahebi-Ala F., Kalantar M., Matin H.R.H., 2014. In ovo injection of vitamin E on post-hatch immunological parameters and broiler chicken performance. Asian Pacific J. Tropical Biomed., 4, S616-S619.

Saunders-Blades J.L., Korver D.R., 2015. Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. Poult. Sci., 94, 1233-1246.

Scanes C.G., Griminger P., 1990. Endocrine-nutrition interactions in birds. J. Exp. Zool. Suppl., 4, 98-105.

Shafey T.M., Mahmoud A.H., Alsobayel A.A., Abouheif M.A., 2014. Effects of "in ovo" administration of amino acids on hatchability and performance of meat chickens. S. Afr. J. Anim. Sci., 44.

Simmons R., 2011. Epigenetics and maternal nutrition: nature v. nurture. Proc. Nutr. Soc., 70, 73-81.

Sinclair K.D., Allegrucci C., Singh R., Gardner D.S., Sebastian S., Bispham J., Thurston A., Huntley J.F., Rees W.D., Maloney C.A., Lea R.G., Craigon J., McEvoy T.G., Young L.E., 2007. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 104, 19351-19356.

Smirnov A., Tako E., Ferket P.R., Uni Z., 2006. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo feeding of carbohydrates. Poult. Sci., 85, 669-673.

Soares J.H. Jr, Kerr J.M., Gray R.W., 1995. 25-hydroxycholecalciferol in poultry nutrition. Poult. Sci., 74, 1919-1934.

Spratt R.S., Leeson S., 1987. Effect of protein and energy intake of broiler breeder hens on performance of broiler chicken offspring. Poult. Sci., 66, 1489-1494.

Sunny N.E., Bequette B.J., 2011. Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. J. Anim. Sci., 89, 3945-3953.

Surai P.F., Fisinin V.I., Karadas F., 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. Anim. Nutr., 2, 1-11.

Surai P.F., Sparks N.H., 2001. Comparative evaluation of the effect of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. Br. Poult. Sci., 42, 252-259.

Tako E., Ferket P.R., Uni Z., 2004. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. Poult. Sci., 83, 2023-2028.

Tesseraud S., Bigot K., Taouis M., 2003. Amino acid availability regulates S6K1 and protein synthesis in avian insulin-insensitive QM7 myoblasts. FEBS Lett., 540, 176-180.

Tesseraud S., Métayer Coustard S., Collin A., Seiliez I., 2009. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. Br. J. Nutr., 101, 1132-1139.

Tesseraud S., Chartrin P., Métayer-Coustard S., Hermier D., Simon N., Peyronnet C., Lessire M., Baéza E., 2014. Modulation of the insulin anabolic signalling cascade in growing chickens by n-3 PUFA. Br. J. Nutr., 111, 761-772.

Tona K., Bamelis F., De Ketelaere B., Bruggeman V., Moraes V.M., Buyse J., Onagbesan O., Decuypere E., 2003. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. Poult. Sci., 82, 736-741.

Tong B.C., Barbul A., 2004. Cellular and physiological effects of arginine. Mini Rev Med Chem., 4, 823-832.

Torres CA, Korver DR., 2018. Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. Poult. Sci., 97, 2996-3003.

Uni Z., Ferket P.R., Tako E., Kedar O., 2005. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poult. Sci., 84, 764-770.

van der Waaij E.H., van den Brand H., van Arendonk J.A., Kemp B., 2011. Effect of match or mismatch of maternal-offspring nutritional environment on the development of offspring in broiler chickens. Animal, 5, 741-748.

Velleman S.G., 2007. Muscle development in the embryo and hatchling. Poult. Sci., 86, 1050-1054.

Veron V., Marandel L., Liu J., Vélez E.J., Lepais O., Panserat S., Skiba S., Seiliez I., 2018. DNA methylation of the promoter region of bnip3 and bnip3l genes induced by metabolic programming. BMC Genomics., 19, 677.

Wang Y.W., Sunwoo H., Cherian G., Sim J.S., 2004. Maternal dietary ratio of linoleic acid to alpha-linolenic acid affects the passive immunity of hatching chicks. Poult. Sci., 83, 2039-2043.

Yair R., Uni Z., 2011. Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. Poult Sci., 90, 1523-1531.

Yair R., Shahar R., Uni Z., 2013. Prenatal nutritional manipulation by in ovo enrichment influences bone structure, composition, and mechanical properties. J. AnimSci., 91, 2784-2793.

Yair R., Shahar R., Uni Z., 2015. In ovo feeding with minerals and vitamin D3 improves bone properties in hatchlings and mature broilers. Poult Sci., 94, 2695-2707.

Yassin H., Velthuis A.G., Boerjan M., van Riel J., 2009. Field study on broilers' first-week mortality. Poult. Sci., 88, 798-804.

Yu L.L., Gao T., Zhao M.M., Lv P.A., Zhang L;, Li J.L., Jiang Y., Gao F., Zhou G.H., 2018. In ovo feeding of L-arginine alters energy metabolism in post-hatch broilers. Poult Sci., 97, 140-148.

Zhao M.M., Gao T., Zhang L., Li J.L., Lv P.A., Yu L.L., Gao F., Zhou G.H., 2017. Effects of in ovo feeding of creatine pyruvate on the hatchability, growth performance and energy status in embryos and broiler chickens. Animal, 11, 1689-1697.

Zhai W., Bennett L.W., Gerard P.D., Pulikanti R., Peebles E.D., 2011c. Effects of in ovo injection of carbohydrates on somatic characteristics and liver nutrient profiles of broiler embryos and hatchlings. Poult. Sci., 90, 2681-2688.

Zuidhof M.J., Schneider B.L., Carney V.L., Korver D.R., Robinson F.E., 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. Poult. Sci., 93, 2970-2982.

Résumé

Le développement de l'embryon d'oiseau dépend de l'environnement dans lequel il baigne et des nutriments disponibles. La période de démarrage (1re semaine post-éclosion) est souvent délicate avec parfois des mortalités post-natales importantes dues aux délais d'alimentation et aux conditions d'ambiance et de transport sub-optimales. Les liens entre la nutrition parentale, la composition de l'œuf et le comportement ultérieur des animaux, leurs performances, et leur sensibilité aux maladies sont bien établis. Des supplémentations en nutriments de l'œuf *via* l'alimentation maternelle ou *via* des injections *in ovo* (« in ovo *feeding* ») représentent alors des stratégies innovantes pour optimiser l'apport de nutriments à l'embryon. La finalité de telles approches est d'optimiser les apports nutritionnels des reproductrices ou des embryons en développement dans le but d'obtenir des poussins de meilleure qualité en termes de robustesse, croissance et/ou composition corporelle en tirant parti de la plasticité embryonnaire d'utilisation des nutriments. La manipulation très précoce de l'environnement dans lequel l'embryon se développe est très prometteuse pour analyser l'influence des conditions précoces sur l'élaboration des phénotypes à long terme que ce soit sur des critère de croissance, composition corporelle, caractéristiques tissulaires, robustesse vis-à-vis de challenges ou adaptation à des conditions d'élevage différentes. Outre les bénéfices observés pour les animaux, ces stratégies alimentaires tentent de répondre aussi à des intérêts environnementaux et économiques.

Abstract

New early nutritional strategies to the benefit of poultry production

The development of the bird embryo depends on the environment in which it is immersed and the nutrients available. The first post-hatching week is often tricky, with sometimes significant postnatal mortalities due to feed delays and suboptimal environmental and transport conditions. Links between parental nutrition, egg composition and subsequent animal behaviour, performance, and disease susceptibility are well established. Nutrient supplementations into the egg via maternal feeding or in ovo *- injections (“*in ovo feeding*”) are thus innovative strategies to optimize nutrient supply to the embryo. The aim of such approaches is to optimize the nutritional supply of breeders or embryos in order to obtain better chick quality in terms of robustness, growth and / or body composition by taking advantage of the embryonic plasticity for nutrient utilization. The precocious manipulation of the environment in which the embryo develops is very promising for analyzing the influence of early conditions on the development of long-term phenotypes whether it is on criteria of growth, body composition, tissue characteristics, and robustness towards challenges or adaptation to different breeding conditions. In addition to the benefits observed for animals, these dietary strategies also attempt to respond to environmental and economic interests.*

MÉTAYER-COUSTARD S., PETIT A., QUENTIN M., TESSERAUD S., 2019. Nouvelles stratégies alimentaires précoces au service de la production avicole. INRA Prod. Anim., 32, 417-430.
https://doi.org/10.20870/productions-animales.2019.32.3.2941

Objectifs, présentation du modèle animal et démarche expérimentale

I. Enjeux

Comprendre les interactions entre le métabolisme, l'élaboration des phénotypes et les capacités d'adaptation des animaux si l'on veut à terme proposer des pratiques de sélection et d'élevage compatibles avec les objectifs de durabilité des filières avicoles.

II. Objectif

Caractériser l'environnement nutritionnel des embryons et comprendre la mise en place de l'orientation métabolique précoce qui conditionne le phénotype ultérieur des poulets de chair.

III. Présentation du modèle

Pour atteindre cet objectif et répondre aux enjeux, la thèse s'est appuyée sur un modèle original de deux lignées sélectionnées spécifiquement sur le pH ultime (pHu) du muscle *Pectoralis major* à l'âge d'abattage (J42) (**Fig. 19**). Ce critère de sélection possède un fort déterminisme génétique (h^2 = 0,57) et reflète les réserves en glycogène musculaire (r^2 = -0,97), principale forme de stockage du glucose dans le foie et les muscles squelettiques. La sélection a été initiée en 2009 à INRAE du Centre Val de Loire, à partir d'une lignée grand-parentale de poulets de chair à croissance rapide, sélectionnée pour un équilibre entre les caractéristiques de croissance et de reproduction. L'intérêt pour les chercheurs étant de contribuer de manière significative à la compréhension du contrôle génétique et physiologique de la qualité de la viande en relation avec la croissance et la composition corporelle (Alnahhas et al., 2014).

A. Effets de la sélection sur les caractéristiques biochimiques et histologiques du muscle *Pectoralis major* à J42

La compréhension du déterminisme biologique du pHu est un point-clé pour maîtriser la qualité de la viande et l'intégrité musculaire. Chez les poulets de chair, les valeurs de pHu se situent entre 5,8 et 5,9 (Qiao et al., 2001 ; Alnahhas et al., 2014). Toutefois, la sélection sur la vitesse de croissance a été associée à un pHu élevé, une teneur réduite en glycogène musculaire et l'émergence de défauts tels que les stries blanches (white striping) ou la viande « de bois » (wooden breast).

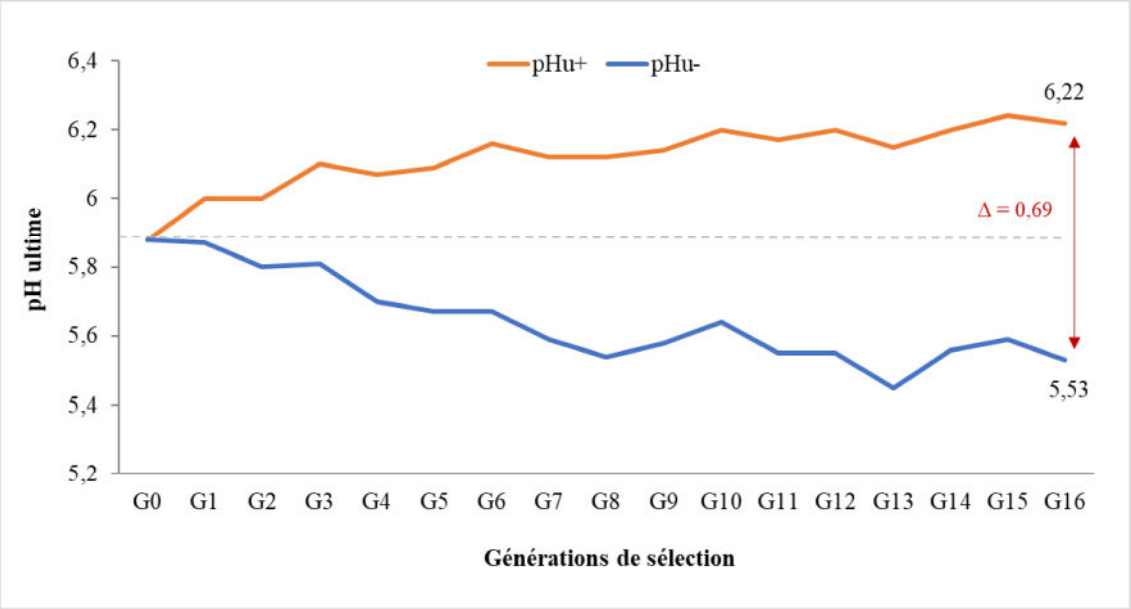


Figure 19 : Evolution du pH ultime, mesuré dans le muscle *Pectoralis major* des lignées pHu+ et pHu-, au cours des générations de sélection.

La ligne en pointillée indique le pH ultime moyen des lignées commerciales de poulet de chair. A la 16ème génération de sélection, un delta de 0,69 unités pH a été observé entre les lignées pHu+ et pHu-

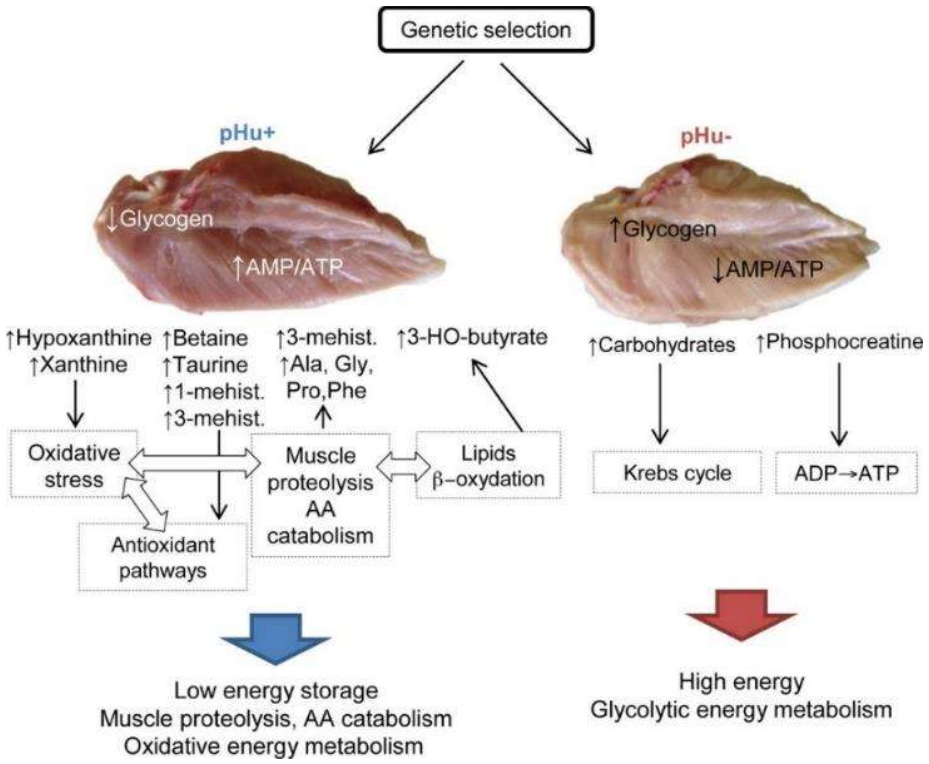


Figure 20 : Modifications métaboliques liées à la sélection sur le pHu (Beauclercq et al., 2016).

Ces physiopathologies, caractérisées par des processus de dégénérescence et de régénération des fibres musculaires ainsi que par la présence de fibrose et adipose, affectent les qualités nutritionnelles et technologiques de la viande, de même que l'image de la production (Kuttappan et al., 2016 ; Petracci et al., 2019 ; Praud et al., 2020). A l'âge d'abattage, une incidence plus élevée de white striping modéré et sévère a été rapportée dans la lignée pHu+ présentant au niveau musculaire, un rendement supérieur, une teneur plus faible en glycogène et un nombre de capillaires sanguins réduit en comparaison à la lignée pHu- (Alnahhas et al., 2015 ; Alnahhas et al., 2016).

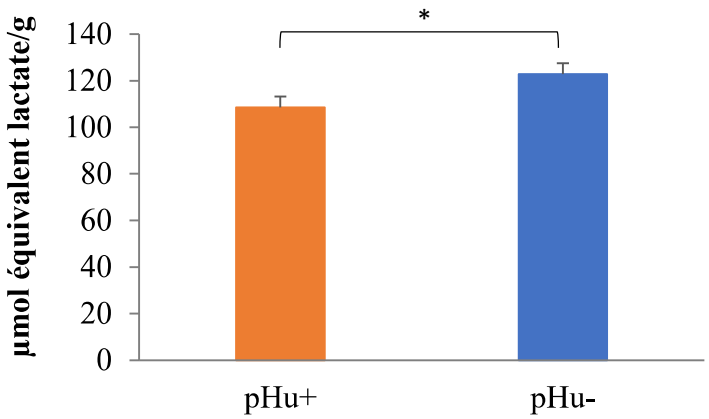
B. Effets de la sélection sur le métabolisme des animaux à J42

Les effets de la sélection sur le métabolisme des lignées pHu (6ème génération) ont été étudiés à J42, en quantifiant les métabolites musculaires et sériques par spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^{1}H) et/ou du phosphore (^{31}P). D'après Beauclercq et al. (2016), les métabolomes sérique et musculaire des animaux pHu- sont caractérisés par une abondance plus élevée en glucides (glucose, glucose-6-phosphate, mannose…) et phosphocréatine, molécule utilisée dans les muscles pour régénérer de l'ATP (**Fig. 20**). Les niveaux accrus de 3-méthylhistidine et de 3-hydroxybutyrate dans le sérum des animaux pHu+ illustrent quant à eux le recourt à la protéolyse musculaire, au catabolisme des acides aminés et à la β-oxydation des acides gras, pour produire de l'énergie. L'alanine et la glycine, acides aminés glucoformateurs, sont également plus abondants dans le muscle des pHu+. Dans un contexte d'approvisionnement plus faible en glucides, une concentration musculaire élevée en alanine est souvent le signe d'un catabolisme plus important des acides aminés pour produire de l'énergie.

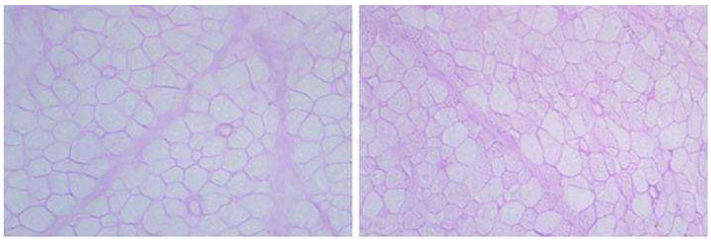
Pour mieux comprendre les voies moléculaires qui sous-tendent les variations de pHu dans la viande des poulets de chair, une analyse transcriptomique a été réalisée sur les mêmes individus (Beauclercq et al., 2017). Parmi les 1436 gènes différentiellement exprimés entre les deux lignées, nombreux sont ceux impliqués dans les processus biologiques en lien avec le développement, le remodelage musculaire et le métabolisme énergétique. L'analyse fonctionnelle a montré l'activation de voies métaboliques différentes entre les deux lignées avec une utilisation intensive du métabolisme des glucides chez les pHu-. En effet, la plupart des gènes impliqués dans la glycolyse et le métabolisme du glycogène (*PRKAB2*, *PRKAG3*, *PHKB*, *PPP1R3A*) étaient plus exprimés dans la lignée pHu-.

A





B



C

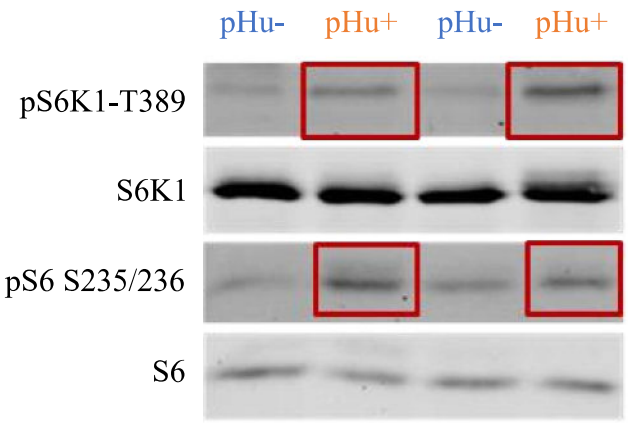


Figure 21 : Caractérisation du métabolisme protéino-énergétique dans le muscle du poussin à l'éclosion.

(**A**) Mesure du potentiel glycolytique (PG = 2 x [glucose total] + [lactate]) du muscle *Pectoralis major* chez les lignées pHu+ et pHu-. (**B**) Coupes transversales de muscle *Pectoralis major* colorées à l'acide périodique de Schiff pour visualiser le glycogène. (**C**) Activation par phosphorylation de régulateurs clés de la synthèse protéique dans le muscle *Pectoralis major* des lignées pHu+ et pHu-. Les membranes ont été incubées avec des anticorps polyclonaux contre les formes totales ou phosphorylées des protéines S6 et S6K1 (Métayer-Coustard et al., 2021).

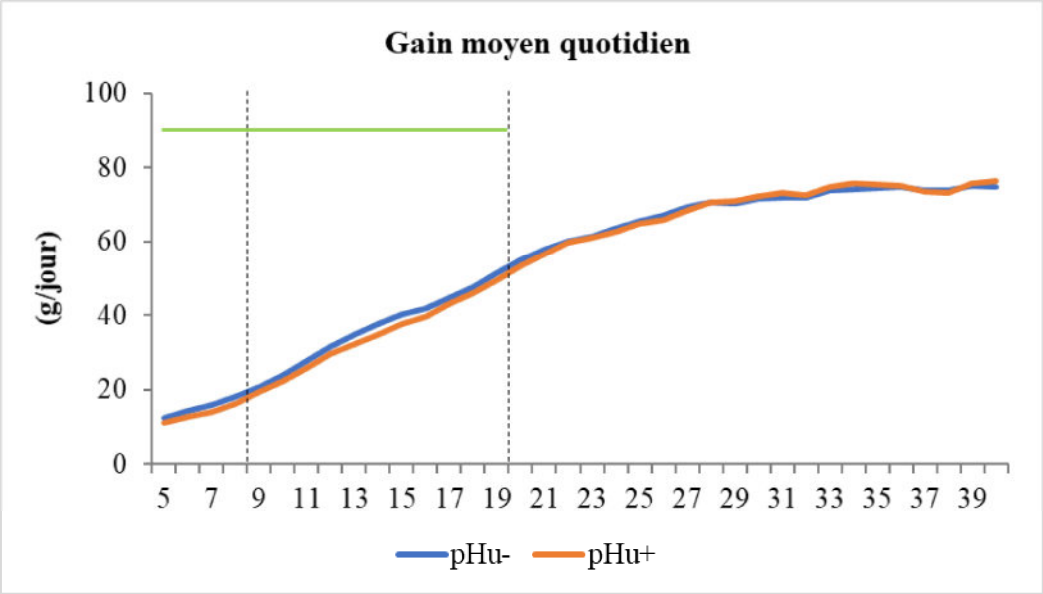
Chez les pHu+, le manque d'énergie se traduit par la surexpression de gènes en lien avec des processus cataboliques alternatifs tels que la protéolyse (*CAPN2*), la β-oxydation des acides gras et la dégradation des acides aminés cétogènes (*HMGCL*, *ACAT2*, *NUDT7*). Les gènes impliqués dans les processus de régénération du muscle (*IFRD1*, *desmine*, *vimentine*) et la protection contre les dommages oxydatifs (*GPX3*, *GPX8*, *GSR*) sont également plus exprimés chez les pHu+.

Pour compléter les études réalisées à l'âge d'abattage et déterminer dans quelle mesure les différences phénotypiques sont établies précocement, les lignées pHu+ et pHu- ont été considérées à l'éclosion (J0) et après 5 jours d'alimentation (J5), stade pour lequel des différences de pHu et de rendement en muscle ont été observées.

C. Effets de la sélection sur le métabolisme des poussins

D'après l'étude des acteurs moléculaires en lien avec le métabolisme énergétique et la synthèse des protéines, les différences observées dans le muscle à l'âge d'abattage sont déjà présentes à l'éclosion (Métayer-Coustard et al., 2021). Les poussins de la lignée pHu- présentent des réserves en glycogène plus importantes que ceux de la lignée pHu+ dans le muscle *Pectoralis major* (**Fig. 21A et B**) et le muscle pipping (*Muscularis complexus*), fortement sollicité à l'éclosion pour percer la coquille. Ils se caractérisent également par une glycémie et des teneurs en triglycérides plasmatiques plus élevées, soulignant l'existence de différences métaboliques entre les deux lignées indépendamment de tout apport en nutriments exogènes (e.g., utilisation des lipides du sac vitellin résiduel). La moindre capacité des pHu+ à stocker les glucides sous forme de glycogène a été associée à une expression plus élevée des gènes *SLC2A1* et *SLC2A3* codant des transporteurs de glucose mais aussi des gènes codant la citrate synthase (CS) et la lactate déshydrogénase (LDH), enzymes impliquées dans le cycle de Krebs et la glycolyse anaérobie. Ces résultats montrent des différences précoces dans le métabolisme des glucides entre les deux lignées et suggèrent des besoins énergétiques plus élevés chez les pHu+ à l'éclosion. Les niveaux de phosphorylation observés pour les protéines S6K1 et S6 (**Fig. 21C**) indiquent quant à eux une plus forte activation de la synthèse protéique chez les pHu+ qui présentent un rendement en muscle plus élevé au 5ème jour post-éclosion. Par ailleurs, les teneurs plus élevées en acide urique dans le plasma indiquent un catabolisme des protéines musculaires et une utilisation des acides aminés plus importants chez les pHu+ pour la production d'énergie.

A



B

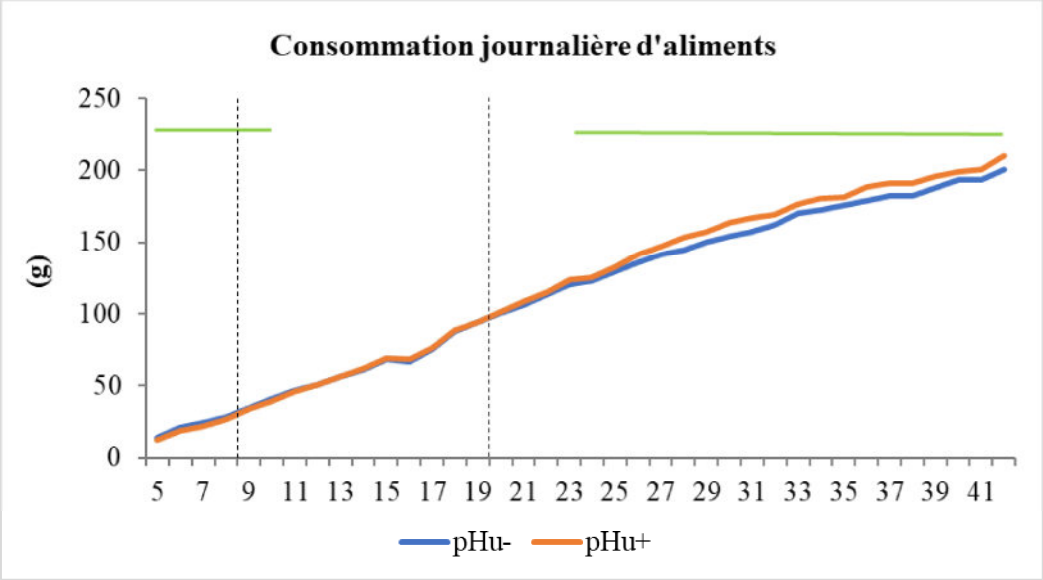


Figure 22 : Evolution du gain moyen quotidien (g/jour) et de la consommation journalière d'aliments (g) entre le 5ème jour post-éclosion et l'âge d'abattage chez les lignées pHu+ et pHu- (Berger et al., 2022).

Les lignes horizontales de couleur verte indiquent les périodes pour lesquelles un effet « lignée » a été observé tandis que les lignes verticales en pointillé indiquent les changements de régime. L'aliment démarrage a été donné de l'éclosion à J8, l'aliment croissance de J9 à J19 et l'aliment finition de J20 à J42.

D. Effets de la sélection sur la croissance et la consommation alimentaire des poussins

L'étude réalisée par Berger et al. (2022) a permis de décrire plus précisément les cinétiques de croissance (**Fig. 22A**) et d'efficacité alimentaire (**Fig. 22B)** chez les lignées pHu entre le 3ème post-éclosion et l'âge d'abattage. Bien que le poids des poussins pHu+ soit plus élevé à l'éclosion, leur consommation journalière d'aliments est plus faible entre le 5ème et le 10ème jour post-éclosion, ce qui explique un poids corporel similaire entre les deux lignées à J5. Chez les pHu+ qui présentent une qualité de poussin et des teneurs en glycogène musculaire moindres à l'éclosion, le démarrage (1ère semaine de vie) est plus difficile avec notamment une altération de la prise alimentaire et un gain moyen quotidien plus faible jusqu'à l'âge de 3 semaines. Bien que les pHu+ aient consommé une plus grande quantité d'aliments à partir de 23 jours d'âge, ils présentent un poids corporel plus faible et un indice de consommation plus élevé traduisant une moindre efficacité métabolique.

E. Effets de la sélection sur la qualité des poussins

Les facteurs de préincubation tels que la souche, l'âge des poules reproductrices, leur alimentation, la durée et/ou la température de stockage des œufs sont autant de facteurs qui peuvent impacter la qualité de l'œuf, le développement embryonnaire et par conséquent, la qualité du poussin éclos et sa viabilité au cours de la première semaine de vie. La qualité du poussin peut être évaluée à l'aide d'indicateurs quantitatifs (poids et longueur du poussin, poids du sac vitellin résiduel) ou qualitatifs (activité et réactivité des poussins, état de l'ombilic, couleur du duvet, conformation des pattes…) décrits dans les grilles de notation de Tona (Tona et al., 2003 ; **Fig. 23**) ou encore via l'étude de fonctions métaboliques (métabolisme énergétique et calcique) et d'indicateurs sanitaires (statut immunitaire, inflammatoire et oxydatif).

Dans le cadre du projet Chick'Tip (CASDAR n°1727 - 2018/2021), des essais en conditions précoces dégradées (âge avancé des reproductrices, stockage long des œufs, temps retardé à l'alimentation) ont permis de mettre en évidence différents profils de qualité avec des poussins robustes, résilients ou de moindre qualité. Ce projet a également permis d'établir un score de qualité supérieur chez les pHu- qui présentent le plus de réserves énergétiques (données non publiées).

Critères	Caractéristiques	Scores
Activité (réflexe)	Bon	**6**
	Mauvais	**0**
Duvet et apparence	Propre et sec	**10**
	Humide	**8**
	Sale et humide	**0**
Sac vitellin/abdomen	Normal	**12**
	Anormal	**0**
Yeux	Bien ouverts et brillants	**16**
	Fermés par intermittence (somnolence)	**8**
	Fermés	**0**
Pattes	Normal	**16**
	Une patte avec rougeur ou inflammation	**8**
	Deux pattes avec rougeur ou inflammation	**0**
Ombilic	Propre et complètement fermé	**12**
	Pas fermé et pas décoloré	**6**
	Pas fermé et décoloré	**0**
Membrane restante	Pas de membrane	**12**
	Peu importante	**8**
	Importante	**4**
	Très importante	**0**
Jaune restant	Pas de jaune	**16**
	Peu important	**12**
	Important	**8**
	Très important	**0**

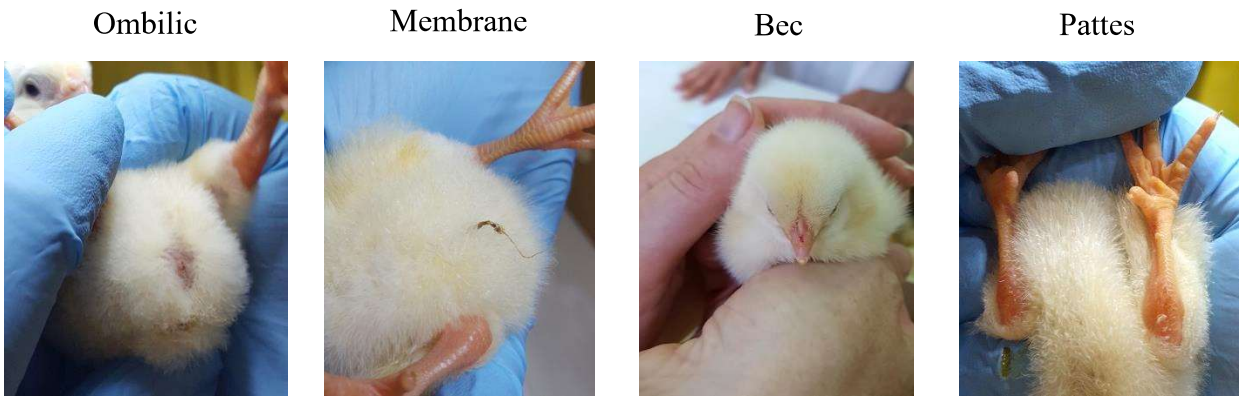


Figure 23 : Critères de qualité du poussin (Tona et al., 2003).

IV. Démarche expérimentale

A l'exception des 18-24 premières heures, le développement embryonnaire s'effectue entièrement dans l'œuf, indépendamment de la mère. Pendant la période d'incubation, le métabolisme de l'embryon va donc évoluer en fonction des nutriments et de l'oxygène disponibles *in ovo*. Dans ce contexte, nous avons établi une démarche expérimentale autour du modèle pHu, visant à **1)** caractériser les principales sources de nutriments *in ovo*, **2)** identifier des signatures métaboliques dans le liquide allantoïque, puis **3)** décrire l'ontogenèse des principales voies et fonctions régissant le métabolisme hépatique et musculaire au cours du développement pré- et post-éclosion. Ces différentes étapes en lien les unes avec les autres ont été structurées en trois chapitres.

A. Caractérisation des principales sources de nutriments *in ovo* chez les lignées pHu+ et pHu-

La composition initiale en nutriments du vitellus et du liquide amniotique a été analysée avant la mise en incubation des œufs (E0) et au 10ème jour du développement embryonnaire (E10), respectivement. Les spectres ont été acquis en utilisant la spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire du proton (RMN ^{1}H), en collaboration avec la plateforme « Analyse des Systèmes Biologiques » de l'Université de Tours (**dispositif expérimental 1**). Cette approche exploratoire à haut-débit, nous a permis d'identifier et de quantifier un certain nombre de métabolites discriminants entre les deux lignées. L'approche par chromatographie en phase gazeuse a ensuite permis de mettre en évidence des différences dans la composition en acides gras du vitellus et la teneur initiale en lipides. Aucune des substances présentes dans le vitellus n'est synthétisée par l'ovaire : toutes sont apportées par le sang et proviennent en majorité du foie dont l'activité de lipogenèse est multipliée par 10 lors de la maturité sexuelle (Sauveur, 1988 ; Bourin et al., 2012). Pour comprendre l'origine des différences observées à E0 entre les deux lignées, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique a été mesurée par une méthode de réaction en chaîne par polymérase (PCR) dans le foie des poules reproductrices âgées de 28 et 29 semaines (pic de ponte). Enfin, nous avons procédé à la caractérisation de la membrane du sac vitellin qui joue un rôle majeur dans la digestion et le transport des nutriments mais également dans la synthèse de glucose et son stockage sous forme de glycogène (Speier et al., 2012 ; Yadgary et Uni, 2012). Les différentes mesures ont été réalisées aux jours 10, 14 et 17 du développement embryonnaire (E10, E14 et E17) en tenant compte de l'activité

métabolique des embryons et de la capacité du sac vitellin à absorber les nutriments (Yadgary et al., 2011 ; Speier et al., 2012 ; van der Wagt et al., 2020).

B. Caractérisation du liquide allantoïque

Pour obtenir une vision d'ensemble de l'environnement nutritionnel des embryons pHu+ et pHu-, nous avons procédé à la caractérisation du liquide allantoïque par spectroscopie RMN ^{1}H. Sa capacité à stocker les déchets azotés et autres composés comme les acides aminés libres en fait un compartiment pertinent pour fournir des indicateurs indirects du métabolisme des embryons. Les liquides ont été collectés aux jours 10, 14 et 17 du développement embryonnaire sur le même dispositif expérimental que le vitellus et le liquide amniotique (**dispositif expérimental 1**).

C. Caractérisation du métabolisme hépatique et musculaire au cours du développement pré- et post-éclosion

Pour aller plus loin, nous avons mesuré l'expression de gènes autour du métabolisme protéino-énergétique dans le foie (véritable carrefour métabolique) et le muscle *Pectoralis major* (tissu cible de la sélection) (**dispositif expérimental 2**). Les tissus ont été prélevés aux jours 12, 14 et 18 du développement embryonnaire (E12, E14, E18), à l'éclosion (J0) et à 8 jours de vie (J8 nourris) afin de visualiser les différents profils d'expression et identifier les gènes différentiellement exprimés entre les pHu+ et pHu-. Pour obtenir une vision globale du métabolisme, l'expression des gènes en lien avec la croissance et le développement, la biogenèse et l'activité mitochondriale, le statut rédox, l'autophagie, la régulation des hormones thyroïdiennes ou encore avec le métabolisme glucidique, protéique et lipidique a été mesurée par PCR quantitative à haut débit, en collaboration avec la plateforme GenomEast de Strasbourg. Afin de disposer d'une quantité suffisante de tissu pour l'ensemble des analyses, des pools de 2 à 3 animaux ont été effectués à E12, E14 et E18. A J0 et J8, les échantillons ont été traités individuellement en considérant le sexe des animaux. Dans cette expérience, les stades E10 et E17 ont été remplacés par les stades E12 et E18 afin de pouvoir prélever le muscle *Pectoralis major* dans son intégralité (prélèvement anatomique) et prendre en compte la vitesse de croissance maximale des embryons. Des dosages biochimiques complémentaires (métabolites sériques, activité créatine kinase dans le sang, potentiel glycolytique du foie) ont été réalisés pour étayer certains résultats.

Nous avons choisi de traiter les données d'expression obtenues pour le tissu hépatique en priorité. En effet, au cours du développement embryonnaire, le foie va avoir un rôle prépondérant en comparaison au muscle *Pectoralis major* principalement mobilisé en fin d'incubation pour fournir des acides aminés.

V. Valorisation des résultats

Le chapitre 1 sur la caractérisation des principales sources de nutriments dans l'œuf a fait l'objet d'une communication orale lors du meeting ***Incubation and Fertility Research Group*** (Tours, France, 2019) puis d'un article scientifique publié en 2022 dans ***Scientific Reports***. Le chapitre 2 visant à identifier des marqueurs indirects du métabolisme embryonnaire dans le liquide allantoïque a été valorisé dans deux communications orales sous forme d'un poster (prix de la meilleure affiche) et d'un pitch de 90 secondes lors du ***34ème Colloque Biotechnocentre*** (Nouan-le-Fuzelier, France, 2022) puis dans un article scientifique publié en 2023 dans ***Scientific Reports***. Les résultats d'ontogenèse présentés dans le chapitre 3 ont donné lieu à un article scientifique soumis à *BMC Genomics* en 2023. Les résultats complémentaires présentés lors du **7th *EAAP International Symposium on Energy and Protein metabolism and nutrition*** (Grenade, Espagne, 2022) sur le métabolisme du glycogène ont été introduits à la suite de cet article.

Lors de la ***Journée Natural Concept*** (Rennes, France, 2022), j'ai également eu l'opportunité de présenter mon sujet de thèse en 180 secondes à des étudiants de l'Institut Agro Rennes-Angers et différents acteurs de la filière avicole (sélectionneurs, éleveurs, vétérinaires…). Cette présentation a remporté le prix « Durabilité des élevages ».

Travaux personnels

Chapitre 1 : Les nutriments disponibles dans l'œuf et leur utilisation par l'embryon sont-ils comparables entre les lignées pHu+ et pHu- au cours de l'incubation ?

Contexte et objectif(s) : Chez les lignées pHu+ et pHu-, sélectionnées de manière divergente sur le pH ultime du muscle *Pectoralis major*, des différences dans le métabolisme énergétique et protéique ont été observées dès l'éclosion (Métayer-Coustard et al., 2021). La présente étude vise donc à caractériser les principales sources de nutriments *in ovo* (vitellus et liquide amniotique) et déterminer dans quelle mesure l'environnement nutritionnel des embryons peut contribuer aux différences métaboliques observées précocement entre les pHu+ et pHu-. Cette approche est d'autant plus importante que le développement de l'embryon se déroule dans une enceinte close, indépendamment de la mère, et que tout changement de composition en nutriments peut influencer le métabolisme et l'élaboration des phénotypes à long terme (croissance, composition corporelle, caractéristiques tissulaires…).

Méthodes : Les œufs ont été obtenus à partir de poules reproductrices âgées de 28 et 29 semaines (pic de ponte). La qualité de la coquille et les caractéristiques physico-chimiques des œufs ont été mesurées avant leur mise en incubation (E0, N = 15 par lignée). A E0 ainsi qu'au 10ème jour du développement embryonnaire (E10), les lipides totaux du vitellus ont été extraits en vue d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer Autosystem, N = 10 par lignée et par stade). Les métabolomes du vitellus (phase hydrosoluble) et du liquide amniotique ont été analysés par spectroscopie RMN du proton (Bruker DRX-600 Avance III HD) en partenariat avec la plateforme « PST Analyse des Systèmes Biologiques » de l'Université de Tours (N = 15 par lignée et par stade). L'expression d'enzymes et transporteurs en lien avec l'utilisation des nutriments (acides aminés, glucides) a été mesurée par PCR quantitative (LightCycler® 480 II) dans la membrane du sac vitellin qui se comporte comme un intestin. Les ARNm ont été extraits à partir d'échantillons collectés aux jours 10, 14 et 17 du développement embryonnaire (E10, E14, E17). La membrane du sac vitellin étant également un tissu actif pour la glycogénolyse, la glycogénèse et le stockage du glycogène avant l'éclosion, nous avons procédé au dosage de cette macromolécule par spectrophotométrie UV visible (Glucose HK, référence 981779, ThermoFisher Scientific).

Résultats : Pour un poids de vitellus comparable entre les deux lignées (E0), le pourcentage de lipides était significativement plus élevé chez les pHu+ (33%) que les pHu- (28%). A l'exception de l'acide adrénique (C22:4 n-6) à E0 et de l'acide myristoléique (C14:1) à E10, la composition en acides gras du vitellus était similaire entre les deux lignées. Bien que la spectroscopie RMN du proton ait montré de nets changements dans la composition du vitellus entre E0 et E10 (i.e. accumulation de métabolites, utilisation du glucose), aucun modèle n'a permis de discriminer les deux lignées. Seule l'analyse individuelle des métabolites a révélé des différences dans l'abondance de certains métabolites (leucine, histidine, glycine, lactate, hypoxanthine et formate). Pendant l'incubation, le vitellus peut être transféré à l'embryon à travers la membrane du sac vitellin hautement vascularisée ou directement dans l'intestin via le pédicule vitellin (van der Wagt et al., 2020). D'après les données d'expression, les pHu+ et pHu- présentent une capacité similaire à transporter et digérer les nutriments via la membrane du sac vitellin. Il en est de même pour la capacité de stockage du glycogène. A E10, l'analyse des profils métaboliques du liquide amniotique a ensuite mis en exergue la présence de 13 métabolites discriminants dont 7 étaient plus abondants chez les pHu- (tyrosine, glutamine, choline, créatine, acétate, inosine, formate) et 6 plus abondants chez les pHu+ (alanine, leucine, isoleucine, 2-oxoisocapoate, glucose, citrate).

Discussion et mise en perspective des résultats : La présente étude a permis de montrer que la sélection génétique appliquée sur le pH ultime de la viande a conduit à des changements dans les caractéristiques externes (pourcentage de coquille, perte de poids durant le stockage…) et internes (composition en nutriments, poids d'albumen, pH du liquide amniotique…) des œufs embryonnés. En comparaison aux pHu-, les embryons de la lignée pHu+ semblent bénéficier d'une plus grande disponibilité en nutriments autres que les glucides (lipides du vitellus et acides aminés du liquide amniotique) et utiliser davantage les lipides du vitellus induisant ainsi une réponse antioxydante plus importante. Ces caractéristiques pourraient expliquer les différences métaboliques et développementales observées dès l'éclosion.

scientific reports

Check for updates

OPEN

Nutrient sources differ in the fertilised eggs of two divergent broiler lines selected for meat ultimate pH

Angélique Petit[1], Sophie Réhault-Godbert[1], Lydie Nadal-Desbarats[2], Estelle Cailleau-Audouin[1], Pascal Chartrin[1], Emilie Raynaud[1], Justine Jimenez[1], Sophie Tesseraud[1], Cécile Berri[1], Elisabeth Le Bihan-Duval[1] & Sonia Métayer-Coustard[1]✉

The pHu+ and pHu− lines, which were selected based on the ultimate pH (pHu) of the breast muscle, represent a unique model to study the genetic and physiological controls of muscle energy store in relation with meat quality in chicken. Indeed, pHu+ and pHu− chicks show differences in protein and energy metabolism soon after hatching, associated with a different ability to use energy sources in the muscle. The present study aimed to assess the extent to which the nutritional environment of the embryo might contribute to the metabolic differences observed between the two lines at hatching. Just before incubation (E0), the egg yolk of pHu+ exhibited a higher lipid percentage compared to the pHu− line (32.9% vs. 27.7%). Although ^{1}H-NMR spectroscopy showed clear changes in egg yolk composition between E0 and E10, there was no line effect. In contrast, ^{1}H-NMR analysis performed on amniotic fluid at embryonic day 10 (E10) clearly discriminated the two lines. The amniotic fluid of pHu+ was richer in leucine, isoleucine, 2-oxoisocaproate, citrate and glucose, while choline and inosine were more abundant in the pHu− line. Our results highlight quantitative and qualitative differences in metabolites and nutrients potentially available to developing embryos, which could contribute to metabolic and developmental differences observed after hatching between the pHu+ and pHu− lines.

In chicken, the ultimate pH (pHu) of meat is a key determinant for poultry meat quality and is largely determined by the muscle glycogen content at slaughter[1,2]. The level of glycogen stored in breast muscle, estimated by the glycolytic potential at slaughter, has been shown to be highly heritable ($h^2 = 0.43$) and negatively correlated with ultimate pH ($rg = -0.97$)[1]. On this basis, two broiler lines called pHu− and pHu+ were divergently selected, from the same population, based on the pHu measurement of the breast muscle[3]. These lines constitute an original model to study the genetic and physiological control of meat quality characteristics associated with muscle glycogen and meat pH variations in chicken.

The pHu+ and pHu− lines were first characterised at slaughter age. At 6 weeks of age, pHu− chickens exhibited a higher breast muscle glycogen content compared to pHu+[3]. This difference was associated with specific blood and muscle metabolic profiles, indicating greater protein catabolism and lipid oxidation in the pHu+ line and greater activation of the glycolytic pathway in the pHu− line[4]. Recently, it has been shown that the divergent metabolic pattern of pHu+ and pHu− lines is set in early during development since, at hatching, the two lines already show differences in protein and energy metabolism that could be related to a different ability to use energy sources at the muscle level[5].

The chicken embryo develops in an egg that forms a natural closed chamber containing all the molecules necessary for its survival and development during the 21 days of incubation. The egg is composed of three main extra-embryonic parts that perform vital functions for the embryo, namely the yolk sac, the amniotic sac and the allantoic sac. Within the first week of embryonic development, the yolk sac begins to form from the developing midgut of the embryo intestine (Fig. 1). It contains the yolk, which is composed of 33% fat, 17% protein and traces of carbohydrates and minerals and will be the main source of nutrients for the embryo during incubation[6,7]. During incubation, yolk nutrients are pre-digested by enzymes such as aminopeptidase N (APN) or sucrase isomaltase (SI) to facilitate their uptake and transport to the embryo via the yolk sac membrane (YSM)

[1]INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly, France. [2]INSERM, Université de Tours, iBrain, 37000 Tours, France. ✉email: sonia.metayer-coustard@inrae.fr

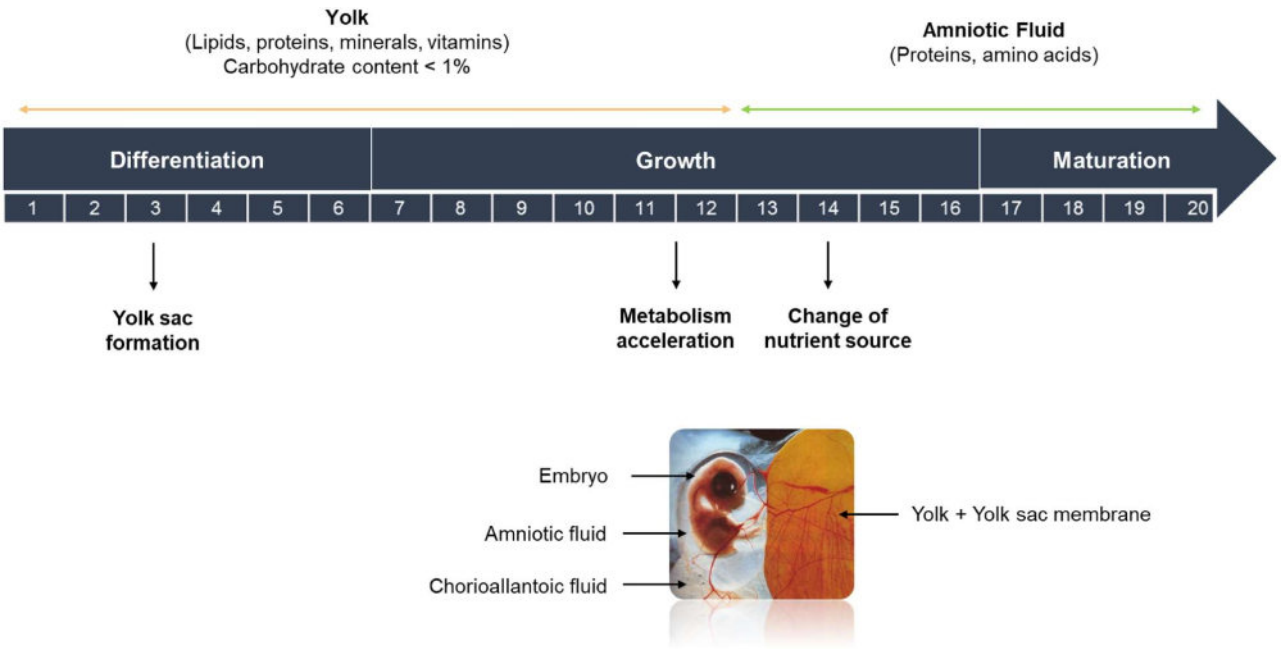


Figure 1. Diagram illustrating the main sources of nutrients for the embryo, the main changes occurring during embryo development and the different embryonic compartments.

endothelial cells[8–11]. This transcytosis from the yolk to the embryonic vessels requires the expression in the YSM of amino acid and peptide transporters (*EAAT*, *gLAT2*, *LAT1*, *CAT1* and *PepT1*) and carbohydrate transporters (*SGLT1*, *SLC2A2* and *SLC2A5*)[8,9].

Around day 12 of development, the metabolic activity of the embryo increases as egg white proteins pass into the amniotic fluid, presumably via the sero-amniotic connection[12], to supply amino acids to the embryo. These new nutrients in the amniotic sac are consumed via the gastro-intestinal tract[13,14] and contribute to increasing the body's glycogen stores[15].

Since differences in muscle glycogen are already present at hatching between the pHu+ and pHu− lines, the question arises as to whether differences in the nutrient profiles of the yolk and amniotic fluid may contribute to this and interact with the metabolic capabilities of each line. To address this question, the physico-chemical and metabolomic characteristics of the yolk and amniotic fluid were determined at different stages of incubation in the pHu+ and pHu− lines. To further explore the line-related differences, the gene expression pattern of nutrient transporters and digestive enzymes were also determined in the yolk sac membrane.

Results

Physico-chemical characteristics of pHu+ and pHu− embryonated eggs. At E0 (before incubation), egg weights were higher in pHu+ than in pHu− (Table 1). This difference was probably due to the higher albumen weight, since yolk and shell weights did not differ between the two lines. Eggs from the pHu+ line had lower proportions of shell, associated with lower static stiffness and breaking strength, and yolk compared to pHu−. Despite a similar weight and pH of yolk (i.e. the main source of nutrients during the first week of embryo development), the embryo weight was higher in pHu+ at E10 (Table 1). At E14, amniotic fluid pH was lower in pHu− than in pHu+.

Yolk lipid content and fatty acid composition in pHu− and pHu+. Yolk composition was measured at E0 and E10 in the two lines (Table 2). At E0, the lipid percentage of yolk was higher (32.9%) in pHu+ than in pHu− (27.7%). It decreased between E0 and E10 in both lines, but to a greater extent in pHu+ (− 28.5%) than in pHu− (− 22.3%), so that the percentage of lipid was not significantly different between the two lines at E10. Overall, the fatty acid composition was quite similar between the two lines, except for the percentage of adrenic acid (C22:4 n-6), which was higher in pHu− at E0, and myristoleic acid (C14:1), a marker of polyunsaturated fatty acid oxidation, which was higher in pHu+ than in pHu− at E10.

To understand the line-related differences in yolk lipid percentage at E0, the expression of genes involved in lipid metabolism was measured in the liver of pHu+ and pHu− breeders, the main site of the de novo synthesis of lipids. The expression of the main enzymes involved in lipogenesis (*FASN*, *FADS1*, *SCD*) was surprisingly over-expressed in the pHu− line (data not shown).

^{1}H-NMR metabolic profile of pHu− and pHu+ egg yolk aqueous phase. The metabolic profile of the yolk aqueous phase was analysed by ^{1}H-NMR spectroscopy at E0 to obtain a snapshot of the initial yolk composition in both lines and at E10 to appreciate the evolution of this composition during embryo development due to nutrient utilisation and enzymatic pre-digestion. Metabolites identified in egg yolk are composed of amino

	pHu+	pHu−	P-value
Egg weight (g)	57.88 ± 0.32	54.73 ± 0.18	**< 0.0001**
Storage weight loss (%/day)	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.004	**0.02**
Eggshell weight (g)	5.18 ± 0.14	5.35 ± 0.09	0.36
Eggshell percentage (% EW)	8.89 ± 0.24	9.74 ± 0.22	**0.01**
Static stiffness, Sd (N/mm)	158.62 ± 5.93	174.96 ± 5.82	**0.05**
Breaking strength, F (N)	33.26 ± 1.30	36.49 ± 1.04	0.06
Yolk weight (g)	14.97 ± 0.20	14.87 ± 0.20	0.84
Yolk (% EW)	25.86 ± 0.33	27.17 ± 0.33	**0.008**
Yolk pH (E0)	5.81 ± 0.02	5.80 ± 0.02	0.95
Yolk pH (E10)	7.10 ± 0.07	7.09 ± 0.04	0.90
Albumen weight (g)	31.60 ± 0.52	29.53 ± 0.32	**0.003**
Albumen (% EW)	54.60 ± 0.87	54.42 ± 0.76	0.87
Albumen pH (E0)	9.17 ± 0.02	9.18 ± 0.02	0.77
Amniotic liquid pH (E10)	7.35 ± 0.05	7.36 ± 0.05	0.95
Amniotic liquid pH (E14)	6.95 ± 0.13	6.69 ± 0.05	**0.03**
Embryo weight (g) (E10)	2.95 ± 0.04	2.78 ± 0.06	**0.03**

Table 1. Egg characteristics of the pHu+ and pHu− lines (N = 15). Data are presented as mean ± s.e.m. Mean comparisons were analysed by Student's t-test or the Mann–Whitney test. When not specified, values concern egg characteristics before incubation (E0). EW: egg weight. Significant values are in bold.

	E0_ pHu+	E0_ pHu−	E10_ pHu+	E10_ pHu−	P-value
Total lipids	32.94 ± 0.92^{a}	27.71 ± 1.08^{b}	23.56 ± 2.25^{bc}	21.53 ± 1.80^{c}	**0.0005**
C14	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.006	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.36
C14:1	0.08 ± 0.003^{ab}	0.07 ± 0.006^{ab}	0.09 ± 0.006^{a}	0.07 ± 0.008^{b}	**0.03**
C16	24.97 ± 0.05	24.87 ± 0.18	25.49 ± 0.24	25.11 ± 0.28	0.27
C16:1	2.74 ± 0.07	2.58 ± 0.10	2.99 ± 0.15	2.74 ± 0.17	0.15
C18	7.33 ± 0.14	7.54 ± 0.17	7.39 ± 0.16	7.48 ± 0.21	0.83
C18:1	39.72 ± 0.41	39.54 ± 0.40	38.71 ± 0.49	39.11 ± 0.67	0.46
C18:2 n-6	20.77 ± 0.41	20.86 ± 0.35	21.06 ± 0.31	21.63 ± 0.38	0.40
C18:3 n-3	1.03 ± 0.05	1.02 ± 0.03	1.03 ± 0.04	1.04 ± 0.05	0.83
C20	0.02 ± 0,001	0.03 ± 0.006	0.03 ± 0.002	0.03 ± 0.003	0.43
C20:1	0.21 ± 0.009	0.21 ± 0.007	0.19 ± 0.007	0.21 ± 0.007	0.41
C20:4 n-6	1.62 ± 0.06	1.64 ± 0.07	1.55 ± 0.07	1.56 ± 0.09	0.77
C22:4 n-6	0.25 ± 0.02^{b}	0.33 ± 0.02^{a}	0.27 ± 0.02^{ab}	0.26 ± 0.009^{b}	**0.01**
C22:5 n-3	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.28
C22:6 n-3	0.78 ± 0.04	0.81 ± 0.05	0.70 ± 0.03	0.73 ± 0.05	0.21
SFA	32.65 ± 0.16	32.76 ± 0.30	33.25 ± 0.23	32.95 ± 0.27	0.31
MUFA	42.74 ± 0.42	42.40 ± 0.39	41.98 ± 0.39	42.12 ± 0.64	0.65
PUFA	24.62 ± 0.42	24.85 ± 0.40	24.77 ± 0.34	24.92 ± 0.68	0.97
n-6	22.64 ± 0.40	22,83 ± 0.36	22.88 ± 0.31	22.99 ± 0.60	0.95
n-3	1.98 ± 0.04	2.02 ± 0.06	1.89 ± 0.04	1.93 ± 0.08	0.42
n-6/n-3	11.47 ± 0.22	11.40 ± 0.27	12.13 ± 0.17	12.00 ± 0.25	0.06

Table 2. Yolk lipid content (%) and fatty acid composition (expressed in % of total lipids) analysis just prior to (E0) and at day 10 (E10) of incubation in pHu+ and pHu− lines (N = 10). Data are presented as mean ± s.e.m. Mean values without a common letter (a, b, c) differ between groups. Mean comparisons were analysed by ANOVA or the Kruskal–Wallis test. FA: fatty acids; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acid. Significant values are in bold.

acids and derivatives (leucine, isoleucine, alanine, valine, phenylalanine, methionine, lysine, glutamine, glycine, histidine, tyrosine, threonine, glutamate, pyroglutamate, aspartate, asparagine, betaine, 2-oxoisocaproate and indoxylsulphate, which results from the degradation of tryptophan), sugars and derivatives (glucose, mannose, myoinositol), fatty acid-associated metabolites (choline, 3-hydroxybutyrate), energy-associated metabolites (fumarate, citrate, lactate), and pantothenate, also called vitamin B5 (Fig. 2). A principal component analysis including both lines and based on the set of detected metabolites allowed us to perfectly discriminate egg yolks

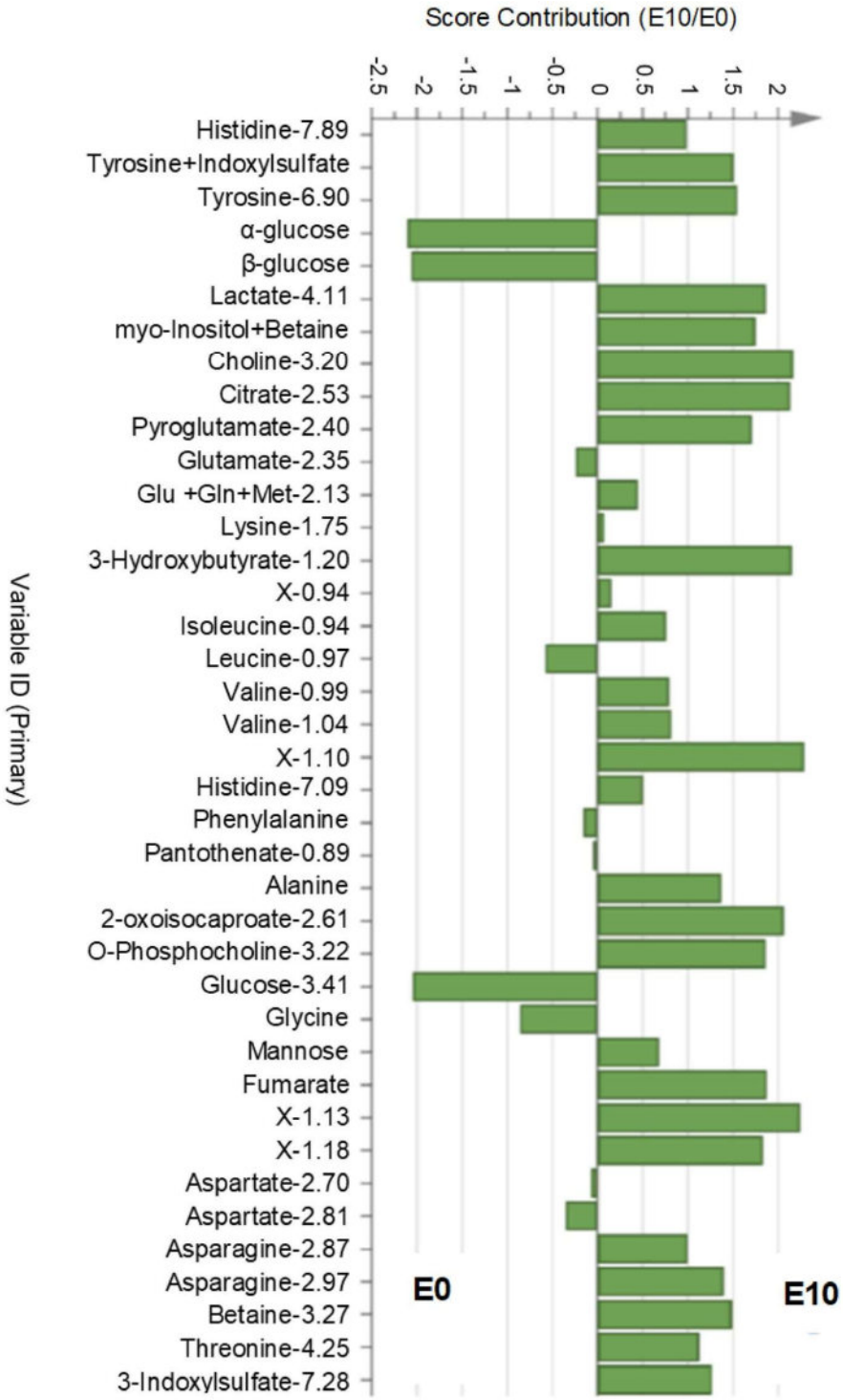


Figure 2. Contribution plot showing the discriminant metabolites identified in the PLS-DA in the yolk between E0 and E10. Glu: glutamic acid, Gln: glutamine, Met: methionine, X-…: unknown compound.

collected at E0 from those collected at E10, indicating a very different composition between these two stages (Supplementary Fig. 1). The unsupervised analysis showed that the main difference between samples was due to the embryonic day (E0 vs. E10). Supervised partial least square discriminant analysis (PLS-DA) allowed for identifying metabolites in which the concentration evolved between the two stages and allowed us to discriminate them (Fig. 2). Among them, glucose, one of the main energy sources of the developing embryo, decreased the most between E0 and E10. The abundance of some amino acids, such as glycine and leucine, also decreased but to a lesser extent. The PLS-DA also revealed that the abundance of many metabolites increased in the yolk

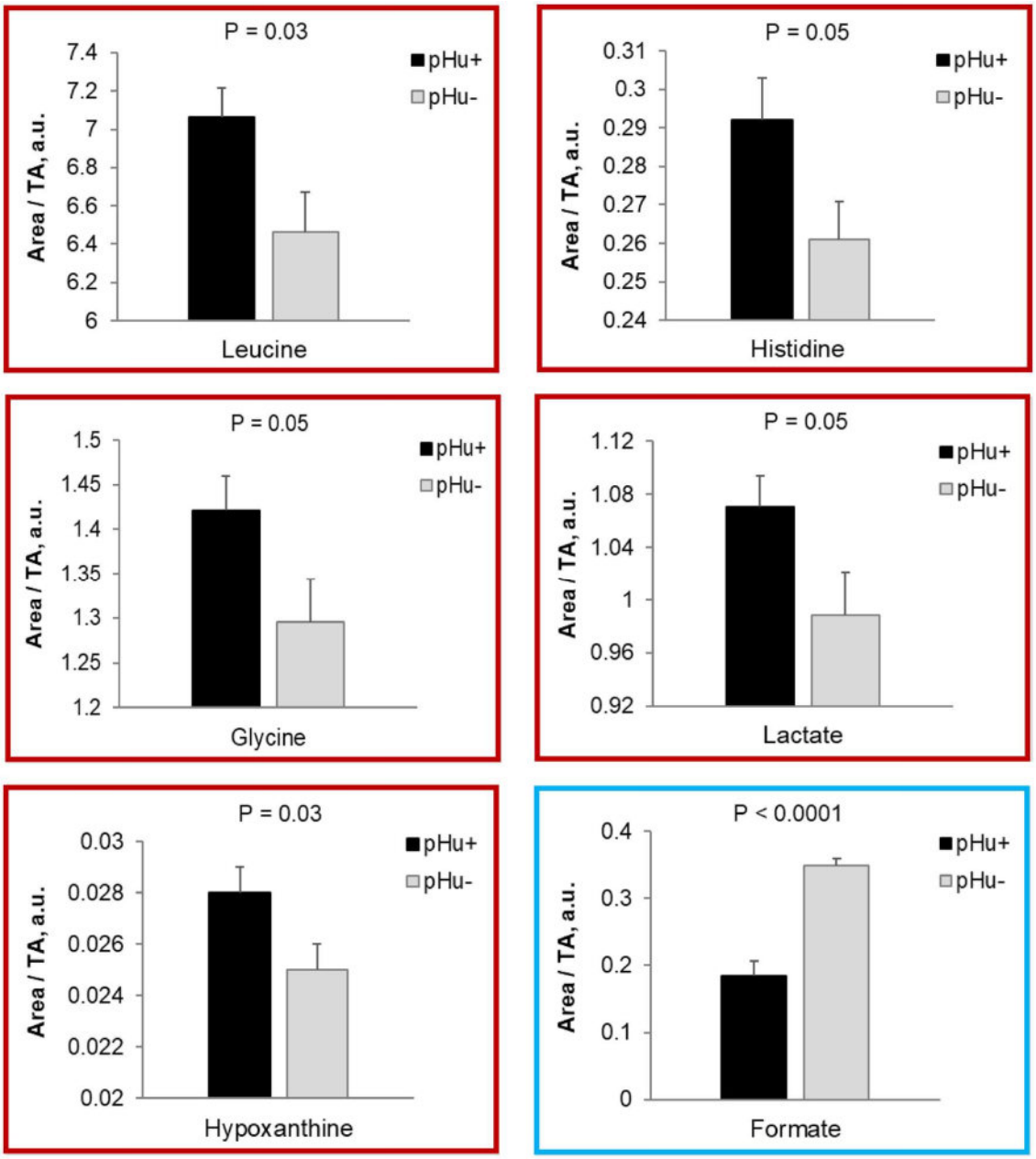


Figure 3. Significantly different metabolites in the yolk of pHu+ and pHu− embryonated eggs at E0 (boxed in red) and E10 (boxed in blue). N = 15. TA: total area, a.u.: arbitrary unit.

between E0 and E10, regardless of the line. This was the case for amino acids like histidine, tyrosine, isoleucine, valine, alanine, asparagine and threonine, and derivatives like pyroglutamate, 2-oxoisocaproate and 3-indoxyl-sulphate. Energy-associated metabolites such as lactate, citrate, 3-hydroxybutyrate, mannose and fumarate, or donors of methyl groups, such as choline and betaine, also increased between E0 and E10.

However, PLS-DA performed at E0 and E10 on the yolk metabolite profiles of pHu+ and pHu− did not discriminate the two lines, although some metabolites were differentially abundant between them at either stage. Thus, concentrations of leucine, histidine, glycine, lactate and hypoxanthine were higher in pHu+ at E0, and formate, an intermediary metabolite in folate-mediated one-carbon metabolism, was lower in pHu+ at E10 (Fig. 3).

^{1}H-NMR metabolic profile of pHu+ and pHu− amniotic fluid. Metabolomics analysis by ^{1}H-NMR spectroscopy of the amniotic fluid was performed at 10 days of incubation (E10), i.e., before embryo metabolism intensifies. PLS-DA was carried out on the ^{1}H-NMR spectral data and the model obtained had a high cross-validated predictive ability (Q^2) of 0.605 and an overall proportion of the variation in Y explained by the model (R^2Y) of 0.754. The reliability of this model was assessed by CV-ANOVA, which gave a P-value equal to 0.00011. The PLS-DA model from the ^{1}H-NMR spectrum provided clear discrimination of the pHu+ and pHu− lines (Fig. 4A). The corresponding contribution plot generated by SIMCA+ software was used to identify the

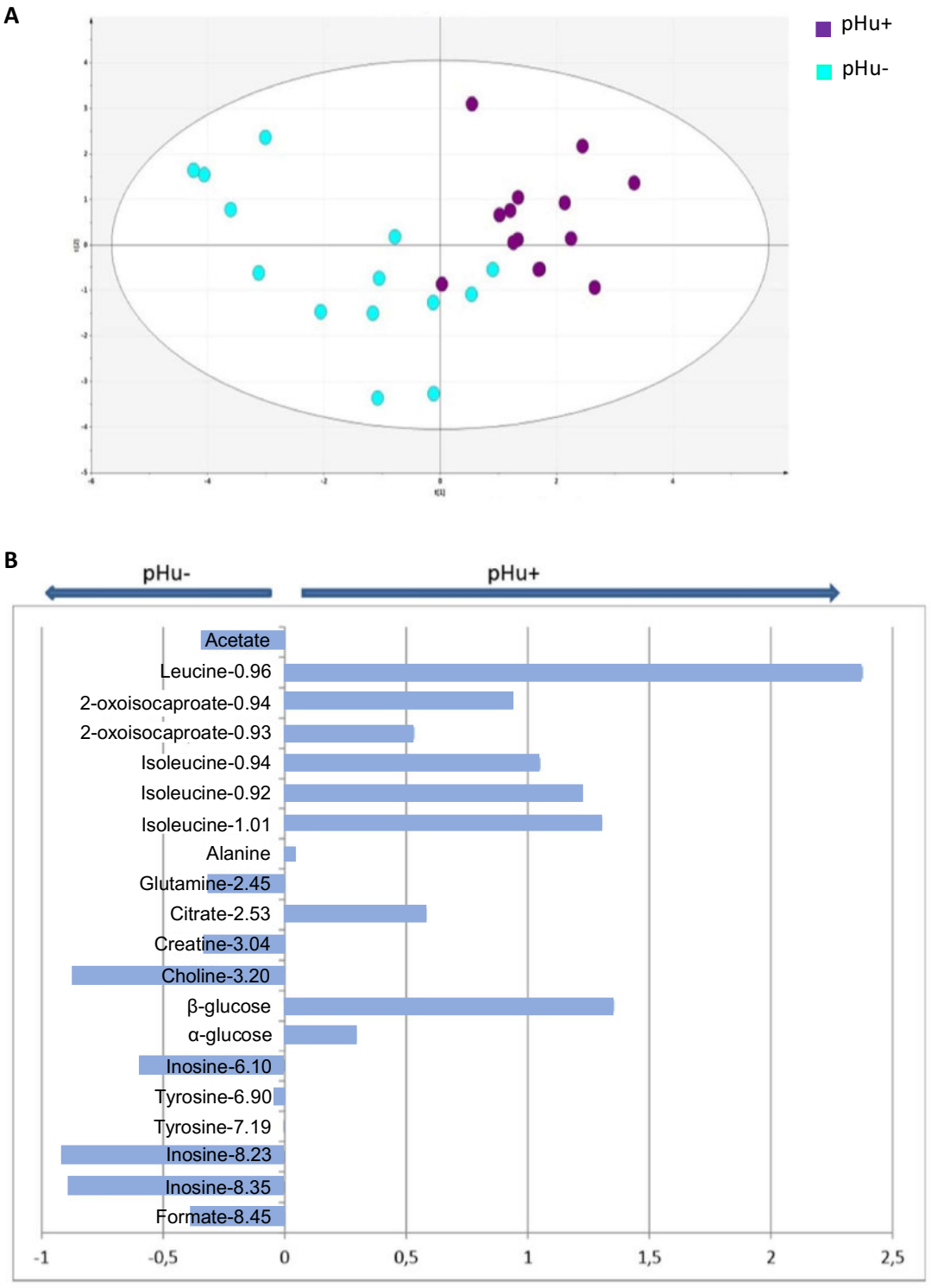


Figure 4. Metabolome score plot following PLS-DA analysis from the ^{1}H-NMR spectrum of the amniotic fluid of pHu+ and pHu− eggs (**A**). pHu+ is represented by purple dots and pHu− by blue dots. The descriptive and predictive performance characteristics of the models are $R^2Y = 0.754$; $Q^2 = 0.605$; CV-ANOVA = 0.00011. Contribution plot giving the discriminant metabolites in the amniotic fluid between pHu+ and pHu− at day 10 of embryonic development (**B**). The horizontal bars represent the enrichment of each metabolite according to the line.

metabolites of the amniotic liquid that permitted discrimination between lines. Twenty buckets representing 13 metabolites contributed to this classification (Fig. 4B). Metabolites such as leucine, isoleucine, 2-oxoisocaproate, β-glucose (variable importance in projection (VIP) > 1) and to a lesser extent alanine, citrate and α-glucose were much more abundant in pHu+ line. Conversely, choline and inosine (VIP > 1) and to a lesser extent creatine, glutamine, acetate and formate were more abundant in the pHu− line.

Gene expression of digestive enzymes and nutrient transporters in the yolk sac membrane of the developing pHu− and pHu+ embryos. The gene expression profiles of digestive enzymes and nutrient transporters were measured in the yolk sac membrane (YSM) at E10, E14 and E17 during embryonic development in both pHu+ and pHu− lines to follow its functionality during the second half of embryonic development.

The YSM expressed digestive enzymes such as APN, which cleaves neutral and basic amino acids from the N-terminal end of peptides[16]. Its mRNA expression was stable over time (E10 to E17) and was not altered by genetic line (Fig. 5). The expression of several transporters of peptides and amino acids, i.e. *CAT1, EAAT, PepT1, LAT1* and *gLAT2* was determined at the mRNA level (Fig. 5). No line or age effect was evidenced for *CAT1* (data not shown). The expression of *EAAT*, which mediates the absorption of aspartate and glutamate, strongly increased at the end of embryonic development, between E14 and E17, in both the pHu+ and pHu− lines. The expression of *PepT1 (*oligopeptide transporter) increased earlier, between E10 and E14, then remained stable. *gLAT2* expression increased from E10 to E17 in both lines ($P < 0.0001$), with the main increase occurring between E14 and E17. On the other hand, *LAT1* gene expression was stable between E10 and E14, and then strongly decreased until E17. No line effect was observed on the mRNA expression of any of the studied peptide or amino acid transporters.

As shown in Fig. 6, the expression of *SI* significantly increased between E10 and E17 in the YSM of both lines ($P < 0.01$). It is worth noting that the average *SI* expression was multiplied by 4.9-fold between E14 and E17 in the pHu− line, while it barely increased in pHu+. The expression of the sodium and glucose cotransporter *SGLT1* increased between E14 and E17 in both lines ($P < 0.05$). The expression profile of the glucose, galactose and fructose transporter *SLC2A2* was biphasic in the pHu+ line only. Its expression decreased between E10 and E14 and then increased between E14 and E17, while it remained quite stable in the pHu− line. The expression of the fructose transporter *SLC2A5* did not vary during embryo development. No line effects were observed for the enzyme *SI* and carbohydrate transporters.

Glycogen content and mRNA expression of genes coding for key glycogenic/gluconeogenic enzymes in the yolk sac membrane. The process of glucose utilisation, glycogen storage and/or glucose release in the yolk sac was examined by evaluating the pattern of expression of key enzymes, i.e. *GYS2*, *GK, FBP1, G6PC2, PEPCK-C* and *PEPCK-M* during embryonic development (E10, E14 and E17) in the pHu+ and pHu− YSM (Fig. 7A). The mRNA expression of genes coding for *GK* (an enzyme involved in gluconeogenesis or glycolysis) and *FBP1* (an enzyme involved in the conversion of fructose 1,6-biphosphate to fructose 6-phosphate) were not affected by age or genetic line (data not shown). The gene expression of *GYS2*, which catalyses the rate-limiting step in the synthesis of glycogen, regularly increased between E10 and E17 in both lines ($P < 0.01$). The gene expression of *G6PC2*, which is involved in the conversion of glucose 6-phosphate to free glucose, slightly increased between E10 and E17 in the pHu− line ($P < 0.01$), but not in pHu+. For *PEPCK*, we considered its two distinct isoforms, i.e. the mitochondrial (*PEPCK-M*) and cytosolic (*PEPCK-C*) forms. *PEPCK-M* and *PEPCK-C* are involved in gluconeogenesis from lactate for *PEPCK-M* and from pyruvate and amino acids for *PEPCK-C*. Gene expression of *PEPCK-M* decreased ($P < 0.01$) while that of *PEPCK-C* increased ($P < 0.001$) between E14 and E17 in both the pHu+ and pHu− lines. No line effects were observed for any of the enzymes studied.

The glycogen concentrations in the YSM of pHu− and pHu+ eggs were determined at E10, E14 and E17 (Fig. 7B). The concentration of glycogen decreased significantly between E10 and E14, from 44 to 32 mg/g, then increased sharply between E14 and E17 to reach 77 mg/g on average. There was no line effect on this parameter during embryo development.

Discussion

Embryo development depends on the integrity of the environment in which it is immersed, but also on the nutrients available. This environment can affect the physiological and morphological development of embryos, with substantial effects on the development of chick phenotypes[17]. At hatching, the divergent lines selected based on breast meat pHu already present distinct phenotypic and metabolic features[5], which may result from quantitative and qualitative differences in available nutrients *in ovo* and/or their use by the embryo. To test this hypothesis, we first investigated the potential line-related differences in egg characteristics, including the composition of the yolk and amniotic fluid, which are the two main sources of nutrients during egg incubation. Characterising the yolk and amniotic fluid at different time points during incubation also allowed us to follow the kinetics of egg nutrient utilisation by the embryo in these two lines.

The yolk is the main source of lipids and the main source of energy, via fatty acid oxidation, during chick embryonic development[11,15,18]. Before embryo development, a higher percentage of lipids was found in the yolk of pHu+ line (32.9%) than in the yolk of pHu− line (27.7%), with a similar weight of yolk. This could partly explain the higher weight of pHu+ embryos compared to pHu− embryos at E10. The lipid percentage observed in the pHu+ line corresponds to values already reported in broiler breeders[19] whereas it appears surprisingly low in the pHu− line. The lipid percentage cannot be easily explained by a difference in the hepatic lipid synthesis of breeders from both lines since the main enzymes involved in lipogenesis (FASN, FADS1, SCD) were not over-expressed in the pHu+ line, but surprisingly in the pHu− line. Transport and/or uptake of lipids into the yolk

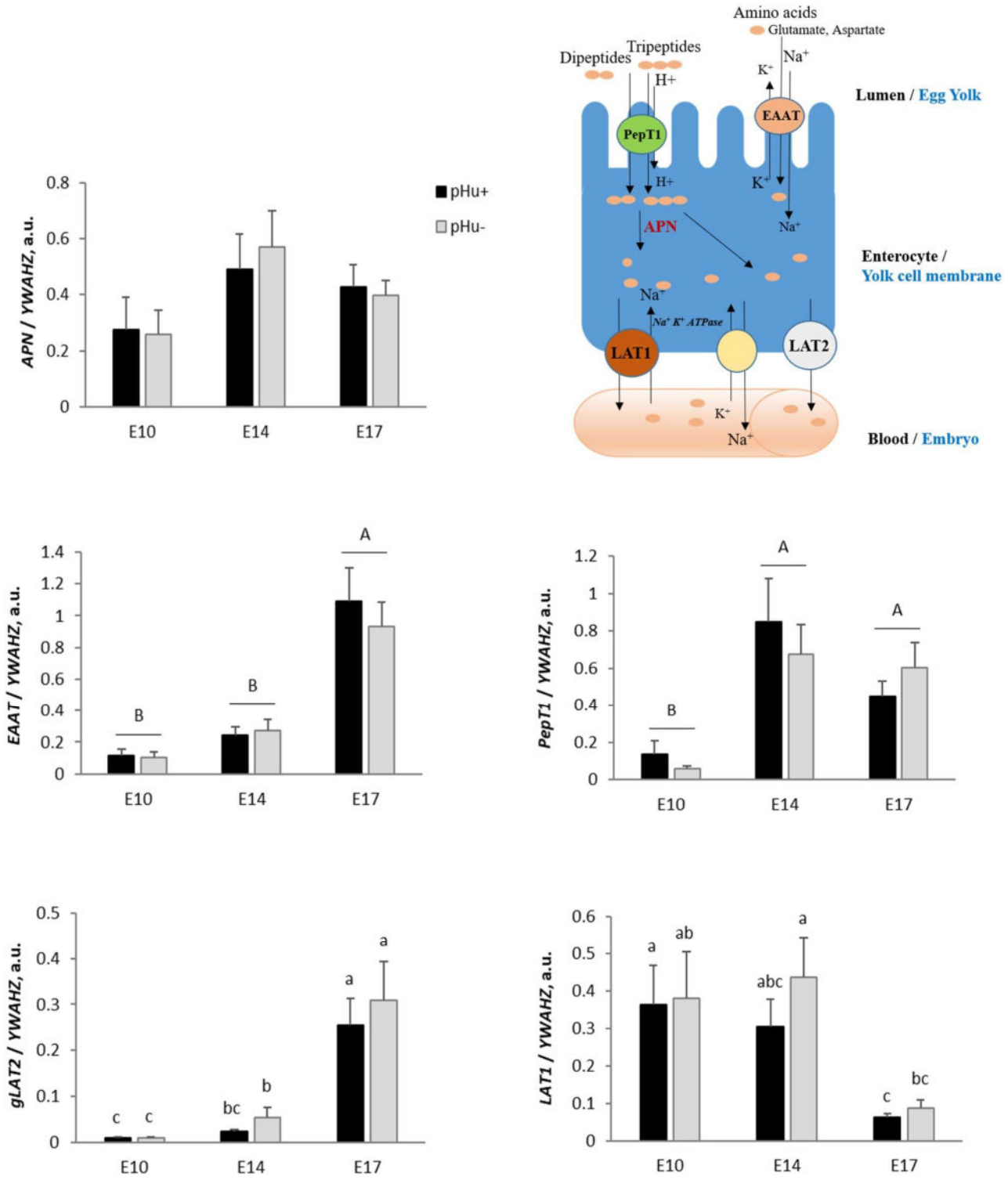


Figure 5. Relative mRNA abundance at E10, E14 and E17 of the digestive enzyme *APN* and peptide and amino acid transporters *EAAT*, *PepT1*, *LAT1* and *gLAT2* in the yolk sac membrane of the pHu+ and pHu− lines. Relative expression of genes (normalised by *YWAHZ* mRNA) was determined by real-time PCR. Data are expressed as means ± s.e.m. (N = 10). Mean comparisons were analysed by the Kruskal–Wallis test. Mean values without a common letter differ between groups (a, b, c) or between ages (**A**,**B**) ($P \leq 0.05$). a.u.: arbitrary unit.

remains to be further explored to explain this difference in lipid deposition in the yolk, knowing that the hens of the two lines received the same diet.

At E10, myristoleic acid (C14:1), a marker of polyunsaturated fatty acid oxidation, was significantly higher in the egg yolk of pHu+ compared to pHu−, which could highlight a more robust lipid oxidation process in this

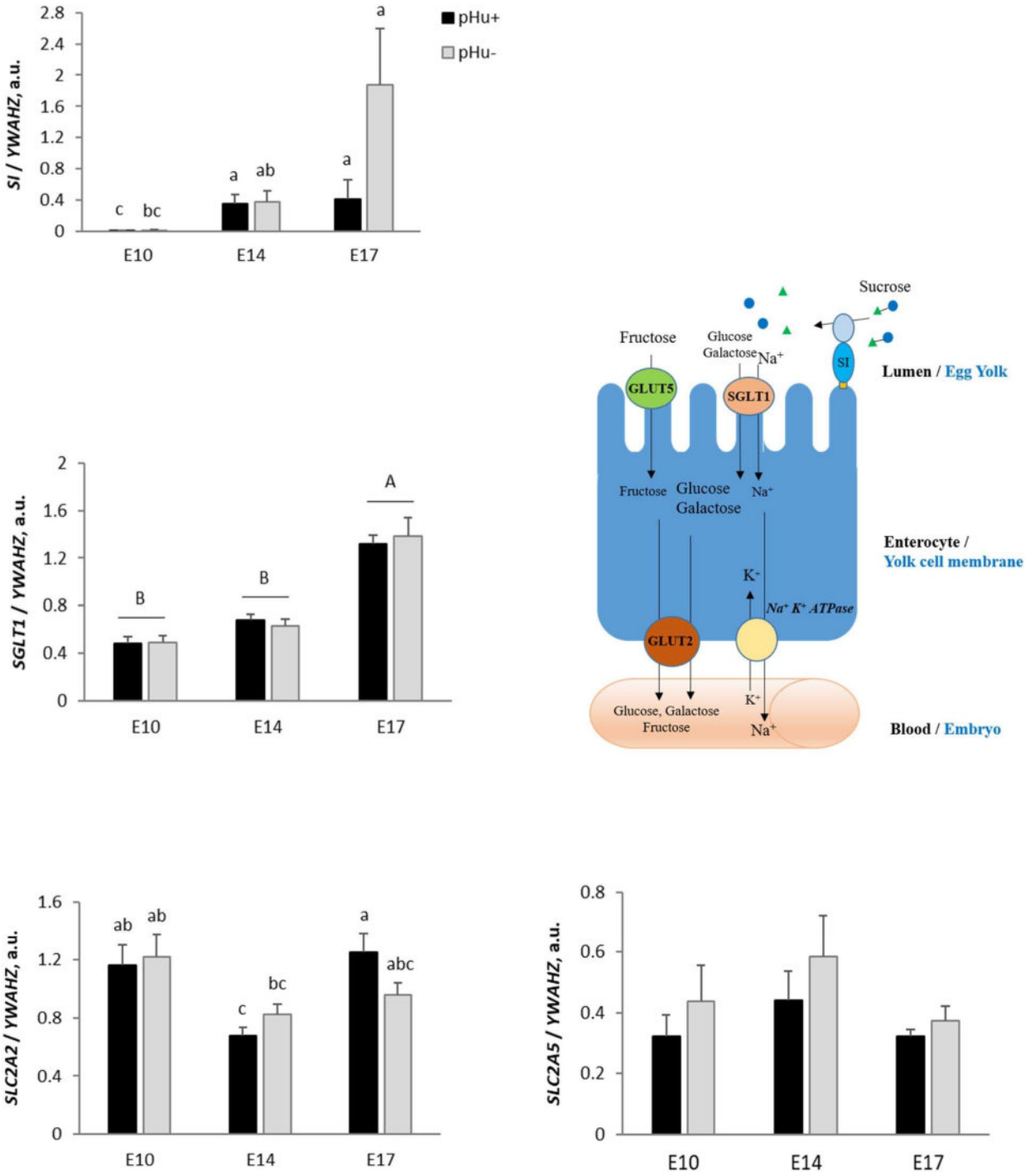


Figure 6. Relative mRNA abundance at E10, E14 and E17 of the digestive enzyme *SI* and carbohydrate transporters *SGLT1, SLC2A2 and SLC2A5* in the yolk sac membrane of the pHu+ and pHu− lines. Relative expression of genes (normalised by *YWAHZ* mRNA) was determined by real-time PCR. Data are expressed as means ± s.e.m. (N = 10). Mean comparisons were analysed by the Kruskal–Wallis test. Mean values without a common letter differ between groups (a, b, c) or between ages (**A**,**B**) ($P \leq 0.05$). a.u.: arbitrary unit.

line. The lower eggshell percentage and thus eggshell thickness observed in pHu+ could contribute to greater gas exchange at the shell level, likely to explain the higher level of fatty acid oxidation in this line. Indeed, invagination during early development of the germ leads to chorionic sac and allantoic cavity formation. In turn, their membranes converge at the eggshell[15]. Between embryonic day 5 and 6, the allantoic sac and the chorion fuse to form the chorioallantoic membrane, a highly vascularised membrane involved in oxygen transport[20,21]. Greater access to O_2 could increase the oxidation of fatty acids, used as a primary source of energy for embryo development[19], in the pHu+ compared to the pHu− yolk.

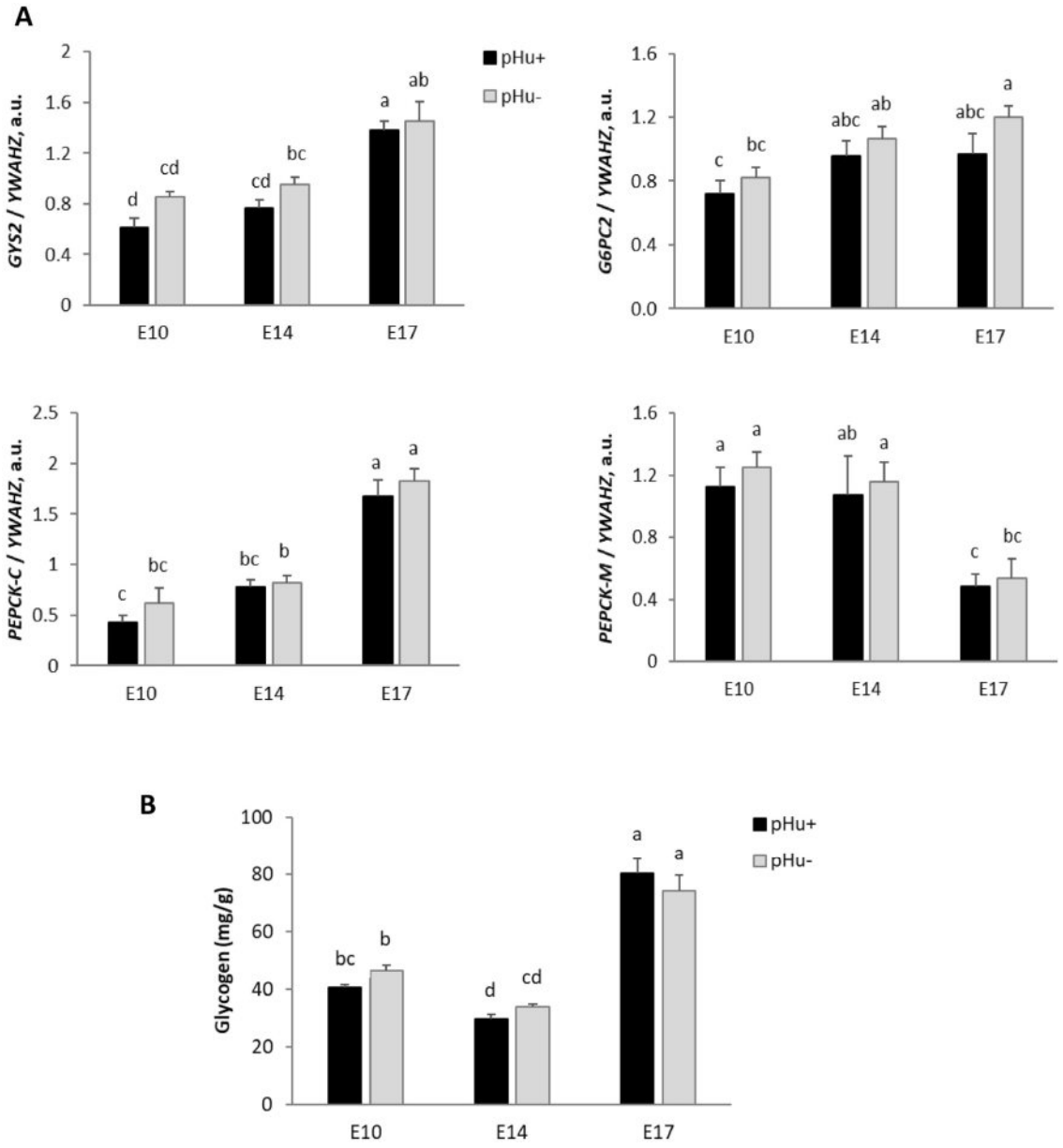


Figure 7. Relative mRNA abundance at E10, E14 and E17 of enzymes involved in carbohydrate metabolism *GYS2*, *G6PC2*, *PEPCK-C* and *PEPCK-M* (**A**) and glycogen measurement (**B**) in the yolk sac membrane of the pHu+ and pHu− lines. Relative expression of genes (normalised by *YWAHZ* mRNA) was determined by real-time PCR. Data are expressed as means ± s.e.m. (N = 10). Mean comparisons were analysed by the Kruskal–Wallis test. Mean values without a common letter differ between groups (a, b, c, d) ($P \leq 0.05$). a.u.: arbitrary unit.

Lipid oxidation induces oxidative stress by the production of free radicals[22,23], which likewise induces an antioxidant response. Among the discriminating metabolites we identified in the yolk at E0, some of them, like histidine, were more abundant in pHu+. The chemical properties of this amino acid are mainly attributed to its imidazole ring, as histidine along with other imidazole-containing compounds present anti-oxidant properties[24]. Therefore, it is likely that greater lipid oxidation observed in pHu+ may induce a greater antioxidant response, which is essential for the protection of the chicken embryo during incubation and of the chick early post-hatch; it thus plays an important role in chick viability[25]. Moreover, glycine, which is involved in both energy production and antioxidant defence through the biosynthesis of creatine and glutathione, respectively[26], was also found to be much more abundant in the pHu+ than in the pHu− egg yolk at E0. The greater abundance of these two molecules is likely to indicate the response to greater oxidative stress in pHu+, as suggested by the greater amount of hypoxanthine (a marker of oxidative stress, Beauclercq et al.[4]) that was observed at E0 in the yolk of this line compared to pHu−.

Carbohydrates provide energy for the initial phase of embryo development[15,27,28]. The carbohydrate content of the egg is very limited, as its concentration is less than 1% of total nutrients and the percentage of free glucose only about 0.3%[6,29]. Although the carbohydrate content is quite low, glucose is an essential nutrient for energy

supply until the chorioallantois has access to the oxygen necessary for fatty acid oxidation[15]. As already described by Yadgary and Uni[30], yolk glucose decreased between E0 and E10. On the contrary, the mannose content increased significantly between E0 and E10, suggesting that this carbohydrate was not consumed by the embryo during this period. For both glucose and mannose, we did not find differences between lines at these stages. While the concentration of glucose in egg yolk did not vary between the lines, it was much higher at E10 in the amniotic fluid of pHu+ compared to pHu−. Compared to earlier stages, higher expression of some genes related to glucose metabolism was observed in the YSM of both lines during the last third of embryonic development, i.e., after E14. This was the case for SI, whose increased expression in the YSM, classically observed at the end of embryonic development[8], may reflect increased carbohydrate digestion to provide substrates for monosaccharide transporters such as SGLT1. This increase between E14 and E17, mainly in the pHu− line ($P = 0.056$), led to an expression level of SI almost 4 times higher in the pHu− line at E17 compared to the pHu+ line. The considerable variability observed at E17, especially in the pHu− line, could mean that the increase in SI mRNA levels occurs more or less early, but could contribute to a greater supply of glucose for pHu− embryos at the end of incubation. Moreover, the expression of G6PC2, involved in the conversion of glucose 6-phosphate into free glucose, also increased between E10 and E17 in the YSM of pHu−, but not in that of pHu+. Except for these line-related differences, no line effect was found for the glycogen content as for the other enzymes involved in glucose utilisation, glucose release and/or glycogen storage in the YSM.

An accumulation of amino acids was observed in the yolk between E0 and E10, regardless of the line. This accumulation is probably due to increased proteolysis following protease activation induced by the pH increase between E0 and E10 (5.80 *vs*. 7.10, respectively). Several proteases and peptidases have already been described in the egg yolk[31]. Cathepsin D, an aspartic protease, is presumed to be a key enzyme for the cleavage of yolk proteins, but other proteases could intervene like aminopeptidase or serine carboxypeptidase. These proteases could cleave the yolk proteins mainly utilised in mid-incubation to supply free amino acids to the developing embryo. Concerning peptide and amino acid transporters in the YSM, their kinetics of expression were similar to those described in the literature[9]. There was no line effect on their expression, which suggested a similar ability to transport amino acids and peptides toward the embryo in the pHu+ and pHu− lines. From E12, the results from literature show changes in the protein profile of the amniotic fluid following protein transfers from the albumen to the amniotic fluid[12,15]. These transfers constitute new sources of available nutrients for the developing embryo during the last week of incubation. Activation of proteases is necessary to generate free amino acids that can be assimilated by the embryo. A study conducted by Da Silva et al.[12] showed an increase in trypsin-like activities between E12 and E16, and the presence of serine endopeptidases, carboxypeptidases and metalloendopeptidases in the amniotic fluid. The metabolomic analyses conducted in the current study show that leucine was more abundant at E0 in the yolk of pHu+ compared to pHu− embryos and that at E10 both leucine and isoleucine were more abundant in the amniotic fluid of pHu+ than that of pHu− embryos. Leucine and isoleucine are branched-chain amino acids (BCAA) essential for the maintenance and growth of tissues. BCAAs play critical roles in the regulation of energy homeostasis, metabolism, immunity and disease[32–35]. They are not only substrates for protein synthesis, but can also play a role as regulators of intracellular signalling pathways that control cell functions and metabolism, including the protein synthesis process itself. The higher BCAA availability in pHu+ embryos from the amniotic fluid could contribute to explaining the better ability of pHu+ muscles to activate the S6K1/S6 pathway (involved in protein synthesis stimulation) previously shown at hatching, and lead to greater breast muscle growth in this line after hatching[5]. Among the discriminating metabolites identified in the amniotic fluid, 2-oxoisocaproate was also more abundant in pHu+. This compound, also named ketoleucine, is a metabolite of leucine, and may exert with leucine a role in protein and energy metabolism[35]. Whatever the compartment analysed (yolk or amniotic fluid), we observed that the formate concentration was higher in the pHu− line. This can be produced from several substrates (methanol, branched chain fatty acids and amino acids), with some reactions being folate-dependent, others not. The carbon of formate is incorporated into nucleic acids and into the glucogenic amino acid serine. Formate is often considered as a biomarker of the alteration of one-carbon metabolism[36], and it plays a crucial role in cellular function by providing methyl groups for the synthesis of DNA, polyamine, amino acids, creatine and phospholipids[37]. Because folate-induced one-carbon metabolism is dependent on B-group vitamins as cofactors for many of the key reactions, formate is also often considered as a biomarker of vitamin B deficiency[38]. In addition to being an intracellular metabolite in one-carbon metabolism, formate can also be seen as an interorgan metabolite that distributes one-carbon groups to tissues[36]. The exact significance of the higher presence of formate in the yolk and amniotic fluid of the pHu− line requires further study, but may indicate greater mono-carbon metabolism in this line, potentially related to different nutrient availability compared to pHu+.

The current study provides original results highlighting that selection specifically applied to a muscle criterion (i.e., breast meat pHu, underlying muscle glycogen variations) measured on growing chickens at 6 weeks can lead to correlated changes in the external and internal characteristics of embryonated eggs. This suggests that such selection likely affects hen metabolism related to egg formation and raises the question of the impact of these modifications at the egg level on the subsequent phenotype of the animal (in particular the glycogen content at the muscle level) and their genetic determinism. Transcriptomic and metabolomic analyses previously performed on 6-week-old chickens revealed an intensive use of carbohydrate metabolism to produce energy in the pHu− line and greater solicitation to alternative oxidative pathways (protein catabolism, lipid oxidation) in the pHu+ line[4,39]. In the present study, egg characteristics provided new evidence that the pHu+ embryo would benefit from greater availability of nutrient sources other than carbohydrates, such as lipids from the egg yolk and amino acids from the amniotic fluid, compared with pHu−. Interactions between the *in ovo* nutritional environment and the embryo will have to be further investigated in order to gain a better understanding of the mechanisms underlying the early establishment of muscle phenotypes in the pHu+ and pHu− lines. To this end, the study of steroid and thyroid hormones as well as the vitamin status of the egg could provide additional

information. Our results also reveal that the embryonic egg is a putative source of predictive indicators or biomarkers of post-hatching muscle phenotypes, some of which being related to subsequent meat quality. Indeed, the development of myopathies in chicken is often linked to an energy deficit in the muscle[39–41]. Therefore, the pHu+/pHu− model could allow to understand whether the nutritional environment of the embryo can influence the subsequent development of muscle defects in chicken, and to identify *in ovo* markers, whose interest will have to be evaluated in a perspective of application in breeding or selection.

Conclusion

The present study showed significant differences in egg characteristics and composition between the pHu+ and pHu− lines. The metabolomic profiles of the egg yolk and amniotic fluid highlighted quantitative and qualitative differences in the nutrients potentially available to developing embryos, which could explain subsequent metabolic and developmental differences. Beyond the comparison of the pHu+ and pHu− lines, the characterisation of the different compartments of the egg appears to be a key element to understand the metabolic orientation of the embryos as a function of their genetics and the availability of nutrients before and after hatching. Characterisation of the egg could also contribute to the identification of early biomarkers, accessible *in ovo*, of the animal's energetic status in relation to its robustness and meat quality.

Methods

Egg characterisation and sample collection. All investigators were certified by the French government to handle animal experiments. Our protocol was submitted to the Comité d'Ethique du Val de Loire (CEEA VdL). All experimental protocols were approved by the Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (number 19). All experiments complied with the ARRIVE guidelines. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. The study was conducted on eggs and embryo issued from the tenth generation of the two genetic lines that were divergently selected for high or low ultimate pH (respectively called pHu+ and pHu−). They were issued from a commercial broiler line. The experiments were carried out at PEAT INRAE Poultry Experimental Facility (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12) (INRAE, Centre Val de Loire, Nouzilly, France). The hens of both groups that produced embryonated eggs received the same diet. Fertile eggs were obtained from laying hens (pHu+ and pHu−) at 28–29 weeks of age, at the peak of lay. Eggs were weighed before and after storage to determine weight loss during storage. Daily weight loss was calculated based on the number of days in storage. Prior to incubation (E0), eggs were weighed. The eggshell quality was evaluated using various measures. The measurements of static stiffness (Sd, quasi-static compression) and breaking strength (F) were carried out using an Instron Type 5543 (Instron, Elancourt, France) on 15 eggs per line. The static stiffness (Sd, N/mm) corresponds to the linear slope of the deformation of the curved force resulting from the load applied to 10 N at a speed of compression of 5 mm/min at the equator of each egg. The breaking strength corresponds to the maximum load (in N) applied to the equator before rupture of the shell. For further egg characterisation, the eggshell, yolk and albumen were separated and weighed (n = 15 per line). The pH of the egg fluids was also measured. The remaining fertile eggs were incubated under standard conditions at 37.8 °C and 56% relative humidity in the experimental hatchery of PEAT to collect the yolk and amniotic fluid on day 10 of incubation (E10) as well as the yolk sac membrane on days 10, 14 and 17 of incubation (E10, E14 and E17) (n = 15 per line and per stage).

Lipid extraction in the yolk. The total lipid content of the yolk and the percentages of saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acids (FAs) within the lipid fraction were determined individually in eggs from the pHu+ and pHu− lines at E0 and E10 (n = 10 by line and by stage). Yolk lipid analysis was conducted by trans-methylation with gas chromatography (Perkin Elmer Autosystem, St. Quentin en Yvelines, France) following the protocol described by Chartrin et al.[42].

Preparation of ^{1}H-NMR samples. Yolk and amniotic fluid were collected by syringe into embryonated eggs from the pHu+ and pHu− lines, at E0 and E10 for the yolk and at E10 for the amniotic fluid (n = 15 per line and per stage). E0 represents the initial stock of nutrients in the yolk and E10 the initial stock of nutrients in the amniotic fluid prior to egg white inflow.

Extraction of yolk metabolites for ^{1}H-NMR spectroscopy was carried out according to Wu et al.[43] using 100 mg of lyophilised yolk. After cold precipitation of lipids and proteins in methanol, samples were homogenised for 30 s prior to the addition of cold chloroform. Samples were homogenised for 1 min, placed on ice for 10 min and then centrifuged (10 min, 12,000*g*, 4 °C). The aqueous phase containing yolk metabolites was collected and dried by solvent evaporation in a SpeedVac (3 h at 35 °C). The dry residue was solubilised in deuterated phosphate buffer (D_2O-P) containing trimethylsilylpropanoic acid (TSP) at 3.2 mM.

The amniotic fluids were collected at E10 and centrifuged to remove cellular debris (10 min, 3000*g*, 4 °C). The supernatants were ultrafiltered on Amicon columns (cut-off 3 kDa) to remove proteins and peptides of high molecular weight and ultrafiltrates were stored at − 80 °C. Ultrafiltrate samples (150 µL) were prepared in 50 µL of D_2O-P (pH 7.4) and 10 µL of TSP, used as a reference in NMR spectroscopy. A volume of 80 µL was added to an Eppendorf tube for 16 randomly selected samples to obtain a reference that could be used for normalising the results.

^{1}H-NMR processing and analysis. The ^{1}H spectra were performed on a Bruker 600 MHz cryoprobe spectrometer. The integration of the NMR peaks is proportional to the concentration of metabolites but also to the number of protons that resonate under the peak. The ^{1}H-NMR spectra were reduced into consecutive and non-overlapping spectral regions (buckets). Each bucket represents a variable. This allows generating a data

Gene symbols[a]	Forward	Reverse
EAAT	TGC TGC TTT GGA TTC CAG TGT	AGC AAT GAC TGT AGT GCA GAA GTA ATA TAT G
PepT1	CCC CTG AGG AGG ATC ACT GTT	CAA AAG AGC AGC AGC AAC GA
LAT1	GAT TGC AAC GGG TGA TGT GA	CCC CAC ACC CAC TTT TGT TT
CAT1	CAA GAG GAA AAC TCC AGT AAT TGC A	AAG TCG AAG AGG AAG GCC ATA A
gLAT2	GCC CTG TCA GTA AAT CAG ACA AGA	TTC AGT TGC ATT GTG TTT GGT T
GYS2	CAT CTG TAC ACT GTG CCC ATG TG	TTT GGA GTG ACA ACA TCA GGA TTT
G6PC2	CCT TCA CAG ACT GAC ATG GTC ATT A	ATG AGG GAA ATG TGT TGC TAT GAA T
GK	TTC GGT GGC TTT TGC ATA ATG	GTC AAA CAC CAT ATG AGC CAT GA
PEPCK-C	TGC GAT GGC TCA GAA GAA GA	GAG CCA ACC AGC AGT TCT CAT
PEPCK-M	CCG AGC ACA TGC TGA TTT TG	ATG GCC AGG TTG GTT TTC C
SGLT1	GCC ATG GCC AGG GCT TA	CAA TAA CCT GAT CTG TGC ACC AGT A
SLC2A2	CAC ACT ATG GGC GCA TGC T	ATT GTG CCT GGA GGT GTT GGT
SLC2A5	TTG CTG GCT TTG GGT TGT G	GGA GGT TGA GGG CCA AAG TC
FBP1	TTC CAT TGG GAC CAT ATT TGG	ACC CGC TGC CAC AAG ATT AC
SI	TCA AAT TCC CTA CGA TGT CCA A	AAC AAG AGC CGG TAA CCC AGT A
APN	AAT ACG CGC TCG AGA AAA CC	AGC GGG TAC GCC GTG TT
FASN	TCT CGA TCT GGC ATA CGA ACT G	CAA CTG GTC CGA GCT TCA AAG
FADS1	CAG CAC CAC GCG AAA CC	TCT ACA GAG AGC TTC TTT CCC AAAG
SCD	TTT GGC AAT CGG CCG TAT	TGG TAG TTG TGG AAA CCT TCT CCTA
YWAHZ	TGA TGT GCT GTC TCT GTT GGA	TGA TAC GCC TGT TGT GAT TGC

Table 3. Primers used for real-time PCR analysis of chicken embryonic tissues (*Gallus* species). Genes[a] = *EAAT*: excitatory amino acid transporter 3, Na^+, H^+ and K^+ dependent; *PepT1*: oligopeptide transporter; *LAT1*: aromatic amino acid transporter; *CAT1*: Na^+ independent cationic amino acid transporter; *gLAT2*: Na^+ independent cationic and Na^+ dependent neutral amino acid transporter; GK: glucokinase; *GYS2*: glycogen synthase 2; *G6PC2*: glucose-6-phosphatase catalytic subunit 2; *PEPCK-C*: cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase; *PEPCK-M*: mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase; *SGLT1*: Na^+ dependent glucose and galactose transporter; *SLC2A2*: Na^+ independent glucose, galactose and fructose transporter; *SLC2A5*: Na^+ independent fructose transporter; *FBP1*: fructose-1,6-biphosphatase; *SI*: sucrase isomaltase; *APN*: aminopeptidase N; *FASN:* fatty acid synthase; *FADS1*: fatty acid desaturase 1; *SCD:* stearoyl-CoA desaturase; *YWAHZ*: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta.

matrix that can be analysed by multivariate statistics. Beforehand, steps involving phasing, correction of the baseline and alignment of the chemical shifts were performed. The area of the buckets for the amniotic fluid was normalised according to the total area of the spectrum, whereas for the lyophilised egg yolk, the normalisation was carried out on the reference because of the presence or not of some peaks according to age. Assignments were done using the databases HMDB (http://www.hmdb.ca) and ChenomX NMR suite 8.1 evaluation edition (ChenomX Inc, Edmonton, Canada).

RNA extraction and RT-qPCR. The messenger ribonucleic acids (mRNAs) were extracted from 100 mg of yolk sac tissue sampled at E10, E14 and E17 using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the recommendations of the manufacturer. The extracted samples were subjected to DNase treatment (Ambion® DNA-free™, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). mRNAs were reverse-transcribed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with Random Primers (Promega, Charbonnieres-les-Bains, France). The sequences of forward and reverse primers used to amplify chicken peptide and amino acid transporters (*EAAT, PepT1, LAT1, CAT1, gLAT2),* carbohydrate transporters *(SGLT1, SLC2A2, SLC2A5)*, enzymes (*GYS2, PEPCK-C, PEPCK-M, G6PC2, GK, SI, APN)* and housekeeping gene *YWAHZ* were specifically designed or based on published literature[8,9,16,30,44–46] (Table 3). The mix containing primers, water and the Takyon (Eurogentec Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue, Angers, France) was distributed in the qPCR plates using ep motion 5070. The cDNA samples were amplified in duplicate by real time PCR using Sybr Green I Master kit (Roche, Mannheim, Germany) and the LightCycler® 480 II apparatus (Roche, Meylan, France). Gene expression levels were estimated on the basis of PCR efficiency and threshold cycle (Ct) deviation of an unknown sample versus a control, as previously described[47]. Their expression was normalised with *YWAHZ* housekeeping gene that was stable between groups.

Expression of genes involved in the lipid metabolism (*FASN*, *FADS1* and *SCD*) was measured in liver of pHu+ and pHu− breeders. Total liver mRNAs were extracted using the RNA Now protocol (CBX-101, Ozyme); the following steps were the same as those described for the yolk sac (Table 3).

Quantitative analysis of glycogen. Glycogen measurement was adapted from the protocol described by Monin and Sellier[48]. The YSM (100 mg) was homogenised in 500 µL of H_2O and 500 µL of cold perchloric acid (PCA, 1 M) using TissueLyser II for 4 min. A volume of 500 µL was centrifuged (20 min, 15,000*g*, 4 °C) to

determine the free-glucose concentration (Glucose HK, ref 981779, ThermoFisher Scientific). The remaining volume was suspended with potassium hydroxide (KOH, 5.4 M) and sodium acetate buffer (0.2 M) added with amyloglucosidase (2 mg/mL, Sigma). The samples were incubated for 3 h at 38 °C with stirring (1400 rpm.). Cold PCA (3 M) was added and, after 10 min at 4 °C, samples were centrifuged (15 min, 15,000*g*, 4 °C). Supernatants were collected for total glucose determination (Glucose HK, ref 981779, ThermoFisher Scientific). Scal (ref 981831, ThermoFisher Scientific) and Abtrol (ref 981044, ThermoFisher Scientific) were used for calibration and quality control, respectively.

A range of glycogen was used to determine the regression line $y = ax + b$.

$$\text{Adjusted } [\text{Glu HK hydrolysis}] \text{ in mg/L} = 2 * [\text{Glu HK hydrolysis}] * 3.3(\text{dilution factor})$$

$$[\text{Glucose derived from glycogen}] \text{ in mg/L} = \text{Adjusted } [\text{Glu HK hydrolysis}] - [\text{Glu HK free}]$$

$$\text{Amount of glycogen in mg} = ([\text{Glucose derived from glycogen}] - b)/a$$

$$[\text{Glycogen}] \text{ in mg/g of tissue} = \frac{([\text{Glucose derived from glycogen}] - b)/a}{\text{Weight (g)}}$$

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with XLSTAT 2020.5.1 software. Values are presented as means ± standard error of mean (s.e.m.). Results were analysed using ANOVA (n comparisons) or Student's t-test (two comparisons) after having checked the normality of the residuals distribution (Shapiro–Wilk test) and the variance homogeneity (Levene test for n comparisons and Fisher test for two comparisons). When the residuals were not normally distributed and/or variances were not homogenous between groups, data were analysed with the non-parametric Kruskal–Wallis test (n comparisons) or by the Mann–Whitney test (two comparisons). A level of significance of 5% ($p \leq 0.05$) was adopted for all tests.

In ^{1}H-NMR spectroscopy, a principal component analysis (PCA) with unsupervised analysis, followed by supervised and discriminant analysis (PLS-DA), were performed using MetaboAnalyst (https://www.metaboanalyst.ca/) and SIMCA software (SIMCA 13.0.3 software (Umetrics, Umeå, Sweden). The overall quality of the model was appreciated by the R^2Y, defined as the proportion of variance in Y explained by the predictive component of the model and Q^2 the predictive ability of the model classes. The higher R^2Y and Q^2, the better the separation between the pHu+ and pHu− lines or stages. A variance analysis (CV-ANOVA) was then applied to further evaluate the significance of the results. Metabolites included in the model with a variable importance in projection (VIP) greater than 1 were considered as important. Samples out of the confidence index (outliers) were removed from the analysis.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 26 July 2021; Accepted: 24 March 2022
Published online: 01 April 2022

References

1. Le Bihan-Duval, E. *et al.* Chicken meat quality: Genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genet.* **9**, 53 (2008).
2. Petracci, M., Mudalal, S., Soglia, F. & Cavani, C. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *Worlds Poult. Sci. J.* **71**, 363–374 (2015).
3. Alnahhas, N. *et al.* Selecting broiler chickens for ultimate pH of breast muscle: Analysis of divergent selection experiment and phenotypic consequences on meat quality, growth, and body composition traits. *J. Anim. Sci.* **92**, 3816–3824 (2014).
4. Beauclercq, S. *et al.* Serum and muscle metabolomics for the prediction of ultimate pH, a key factor for chicken-meat quality. *J. Proteome Res.* **15**, 1168–1178 (2016).
5. Métayer-Coustard, S. *et al.* Early growth and protein-energy metabolism in chicken lines divergently selected on ultimate pH. *Front. Physiol.* **12**, 144 (2021).
6. Romanoff, A. L. & Romanoff, A. J. *The Avian Egg* (Wiley, 1949).
7. van der Wagt, I., de Jong, I. C., Mitchell, M. A., Molenaar, R. & van den Brand, H. A review on yolk sac utilization in poultry. *Poult. Sci.* **99**, 2162–2175 (2020).
8. Yadgary, L., Yair, R. & Uni, Z. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. *Poult. Sci.* **90**, 410–416 (2011).
9. Speier, J. S., Yadgary, L., Uni, Z. & Wong, E. A. Gene expression of nutrient transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick. *Poult. Sci.* **91**, 1941–1949 (2012).
10. Bauer, R. *et al.* The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 108–1098 (2013).
11. Wong, E. A. & Uni, Z. Centennial review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poult. Sci.* **100**, 100821 (2021).
12. Da Silva, M., Labas, V., Nys, Y. & Réhault-Godbert, S. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. *Poult. Sci.* **96**, 2931–2941 (2017).
13. Oegema, T. R. Jr. & Jourdian, G. W. Metabolism of ovomucoid by the developing chick embryo. *J. Exp. Zool.* **189**, 147–161 (1974).
14. Sugimoto, Y. *et al.* Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and thermal stability. *J. Biol. Chem.* **274**, 11030–11037 (1999).
15. Moran, E. T. Jr. Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poult. Sci.* **86**, 1043–1049 (2007).

16. Gilbert, E. R., Li, H., Emmerson, D. A., Webb, K. E. Jr. & Wong, E. A. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. *Poult. Sci.* **86**, 1739–1753 (2007).
17. Ho, D. H., Reed, W. L. & Burggren, W. W. Egg yolk environment differentially influences physiological and morphological development of broiler and layer chicken embryos. *J. Exp. Biol.* **214**, 619–628 (2011).
18. Cherian, G. Nutrition and metabolism in poultry: Role of lipids in early diet. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **6**, 28 (2015).
19. Sahan, U., Ipek, A. & Sozcu, A. Yolk sac fatty acid composition, yolk absorption, embryo development, and chick quality during incubation in eggs from young and old broiler breeders. *Poult. Sci.* **93**, 2069–2077 (2014).
20. Everaert, N., Willemsen, H., Willems, E., Franssens, L. & Decuypere, E. Acid-base regulation during embryonic development in amniotes, with particular reference to birds. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **178**, 118–128 (2011).
21. Nowak-Sliwinska, P., Segura, T. & Iruela-Arispe, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* **17**, 779–804 (2014).
22. Migliorini, M. J. *et al.* Oregano essential oil in the diet of laying hens in winter reduces lipid peroxidation in yolks and increases shelf life in eggs. *J. Therm. Biol.* **85**, 102409 (2019).
23. Salles, G. *et al.* Lipid peroxidation and protein oxidation in broiler breast fillets with white striping myopathy. *J. Food Biochem.* **43**, e12792 (2019).
24. Holeček, M. Histidine in health and disease: Metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients* **12**, 848 (2020).
25. Surai, P. F., Fisinin, V. I. & Karadas, F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* **2**, 1–11 (2016).
26. Razak, M. A., Begum, P. S., Viswanath, B. & Rajagopal, S. Multifarious beneficial effect of nonessential amino acid, glycine: A review. *Oxid. Med. Cell Longev*. **2017**, 1716701. https://doi.org/10.1155/2017/1716701 (2017).
27. Romanoff, A. L. *Biochemistry of the Avian Embryo* (Wiley, 1967).
28. Hu, Q., Agarwal, U. & Bequette, B. J. Gluconeogenesis, non-essential amino acid synthesis and substrate partitioning in chicken embryos during later development. *Poult. Sci.* **96**, 414–424 (2017).
29. Givisiez, P. *et al.* Chicken embryo development: Metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult. Sci.* **99**, 6774–6782 (2020).
30. Yadgary, L. & Uni, Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. *Poult. Sci.* **91**, 444–453 (2012).
31. Bourin, M. *et al.* Transcriptomic profiling of proteases and antiproteases in the liver of sexually mature hens in relation to vitellogenesis. *BMC Genomics* **13**, 457 (2012).
32. Li, F., Yin, Y., Tan, B., Kong, X. & Wu, G. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids* **41**, 1185–1193 (2011).
33. Lynch, C. J. & Adams, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 723–736 (2014).
34. Bai, J., Greene, E., Li, W., Kidd, M. T. & Dridi, S. Branched-chain amino acids modulate the expression of hepatic fatty acid metabolism-related genes in female broiler chickens. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 1171–1181 (2015).
35. Duan, Y. *et al.* The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids* **48**, 41–51 (2016).
36. Washburn, S. E. *et al.* Formate metabolism in fetal and neonatal sheep. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E921–E927 (2015).
37. Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y. & Sinclair, K. D. One-carbon metabolism: Linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development. *Ann. Rev. Anim. Biosci.* **7**(1), 263–287 (2019).
38. Lamarre, S. G., Morrow, G., Macmillan, L., Brosnan, M. E. & Brosnan, J. T. Formate: An essential metabolite, a biomarker, or more?. *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**, 571–578 (2013).
39. Beauclercq, S. *et al.* Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. *Sci. Rep.* **7**, 6447 (2017).
40. Abasht, B., Mutryn, M. F., Michalek, R. D. & Lee, W. R. Oxidative stress and metabolic perturbations in wooden breast disorder in chickens. *PLoS ONE* **11**(4), e0153750 (2016).
41. Alnahhas, N. *et al.* Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genet.* **17**, 61 (2016).
42. Chartrin, P. *et al.* Effect of genotype and overfeeding on lipid deposition in myofibres and intramuscular adipocytes of breast and thigh muscles of ducks. *Reprod. Nutr. Dev.* **45**, 87–99 (2005).
43. Wu, H., Southam, A. D., Hines, A. & Viant, M. R. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal. Biochem.* **372**, 204–212 (2008).
44. Gao, T. *et al.* Effect of in ovo feeding of l-arginine on the hatchability, growth performance, gastrointestinal hormones, and jejunal digestive and absorptive capacity of posthatch broilers. *J. Anim. Sci.* **95**, 3079–3092 (2017).
45. Wang, C. L., Fan, Y. C., Wang, C., Tsai, H. J. & Chou, C. H. The impact of Salmonella Enteritidis on lipid accumulation in chicken hepatocytes. *Avian Pathol.* **45**, 450–457 (2016).
46. Kaminski, N. A. & Wong, E. A. Differential mRNA expression of nutrient transporters in male and female chickens. *Poult. Sci.* **97**, 313–318 (2018).
47. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
48. Monin, G. & Sellier, P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Sci.* **13**, 49–63 (1985).

Acknowledgements

The authors thank the staff of PEAT INRAE Poultry Experimental Facility (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12) for producing and rearing animals, and the technicians of the BOA unit (INRAE, UMR BOA, Nouzilly, France) for measurements on birds, sampling and laboratory analyses. We thank Magali Chessé, Nelly Bernardet and Mylène Da Silva (INRAE, University of Tours, Nouzilly, France) for their help with collecting egg samples. This work was supported by the INRAE "Animal Physiology and Livestock Systems" Division [ACI_PHASE2017_INOVE]. This article has been proofread by PRS (Proof-reading-Service.com).

Author contributions

S.R.G., E.L.D. and S.M.C. conceived and designed the experiments. S.M.C. supervised the study. A.P., S.R.G., L.N.D., E.C.A., P.C., E.R., J.J. and S.M.C. performed the experiments. A.P., L.N.D., E.C.A., P.C. and S.M.C. analysed the data. A.P. drafted the first version of the manuscript under the supervision of S.M.C., E.L.D., S.T., S.R.G. and C.B. All of the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-022-09509-x.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M.-C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2022

Chapitre 2 : Peut-on mettre en évidence des signatures métaboliques spécifiques dans le liquide allantoïque des œufs pHu+ et pHu- ?

Contexte et objectif(s) : L'allantoïde est un diverticule endodermique de l'intestin postérieur qui se forme à partir de 60 heures d'incubation. Il croît rapidement, envahit la cavité séro-amniotique puis recouvre l'amnios et la vésicule vitelline. Sa capacité à stocker les déchets azotés et autres composés comme les acides aminés libres en fait un compartiment pertinent pour fournir de manière moins invasive des indicateurs indirects du métabolisme des embryons. Dans les derniers stades du développement, certains nutriments comme les acides aminés peuvent être réabsorbés puis transférés à l'embryon (Da Silva et al., 2017).



© A. PETIT

Méthodes : Les liquides allantoïques ont été collectés aux jours 10, 14 et 17 du développement embryonnaire, à partir d'œufs embryonnés pHu+ et pHu- issus du même dispositif que pour le vitellus et le liquide amniotique. Le métabolome des 90 échantillons (N = 15 par lignée et par stade) a été exploré à l'aide d'un spectromètre Bruker DRX-600 Avance III HD, en partenariat avec la plateforme « PST Analyse des Systèmes Biologiques » de l'Université de Tours. Les spectres ont ensuite été analysés par OPLS-DA (Analyse discriminante par projections orthogonales des moindres carrés partiels) à l'aide du logiciel SIMCA.

Résultats : L'analyse des spectres a permis l'identification et la quantification de 40 métabolites (sur l'ensemble de la cinétique) dont 18 étaient communs avec le liquide amniotique et le vitellus. Parmi les 9 métabolites spécifiques du liquide allantoïque, 6 sont issus du catabolisme des acides aminés tels que l'histidine (urocanate), le tryptophane (kynurénine, 3-HOkynurénine, nicotinate), la valine et la leucine (3-HOisobutyrate, 2-HOisovalerate).

Les analyses multivariées effectuées sur l'ensemble des stades et des lignées ont mis en exergue un effet stade important, un enrichissement en métabolites à E17 et une augmentation de la variabilité interindividuelle au cours du développement. L'étude individuelle des stades a ensuite permis d'obtenir 3 modèles de qualité et d'identifier les métabolites discriminants entre les lignées pHu+ et pHu- (X = 18 à E10, X = 14 à E14 et X = 35 à E17). Parmi ces trois modèles, les valeurs de Q^2 (qualité de la prédiction) et R^2Y (séparation des classes) étaient plus élevées pour le stade E10, ce qui atteste d'une meilleure discrimination des lignées.

Le liquide allantoïque des pHu+ était caractérisé par une sur-représentation en formate, acides aminés ramifiés, intermédiaires du cycle de Krebs et métabolites issus du catabolisme des acides aminés et β-oxydation des lipides tandis que le liquide allantoïque des pHu- était plus riche en glucose, intermédiaires du métabolisme des purines et dérivés du métabolisme du tryptophane et de l'histidine. L'hypoxanthine (base purique dérivée de l'inosine), le glutamate (acides α-aminés) et le glucose (sucre) sont apparus comme les métabolites les plus discriminants entre les lignées pHu+ et pHu- à E10, E14 et E17, respectivement.

Discussion et mise en perspective des résultats : La caractérisation du vitellus, du liquide amniotique et maintenant du liquide allantoïque a permis d'obtenir une vision d'ensemble sur l'environnement nutritionnel des embryons pHu+ et pHu-. L'étude du liquide allantoïque a également révélé l'existence de signatures métaboliques précoces, dès E10, chez les embryons pHu+ et pHu-. En raison d'une disponibilité moindre en substrats énergétiques, les pHu+ ont recourt à différentes voies cataboliques pour produire de l'énergie. L'ensemble de ces résultats, a permis de considérer de l'œuf comme une source potentielle d'indicateurs ou de biomarqueurs du métabolisme des embryons et des phénotypes ultérieurs.

scientific reports

OPEN

Allantoic fluid metabolome reveals specific metabolic signatures in chicken lines different for their muscle glycogen content

Angélique Petit[1], Sophie Tesseraud[1], Stéphane Beauclercq[1], Lydie Nadal-Desbarats[2], Estelle Cailleau-Audouin[1], Sophie Réhault-Godbert[1], Cécile Berri[1], Elisabeth Le Bihan-Duval[1] & Sonia Métayer-Coustard[1]✉

Nutrient availability in eggs can affect early metabolic orientation in birds. In chickens divergently selected on the *Pectoralis major* ultimate pH, a proxy for muscle glycogen stores, characterization of the yolk and amniotic fluid revealed a different nutritional environment. The present study aimed to assess indicators of embryo metabolism in pHu lines (pHu+ and pHu−) using allantoic fluids (compartment storing nitrogenous waste products and metabolites), collected at days 10, 14 and 17 of embryogenesis and characterized by 1H-NMR spectroscopy. Analysis of metabolic profiles revealed a significant stage effect, with an enrichment in metabolites at the end of incubation, and an increase in interindividual variability during development. OPLS-DA analysis discriminated the two lines. The allantoic fluid of pHu− was richer in carbohydrates, intermediates of purine metabolism and derivatives of tryptophan-histidine metabolism, while formate, branched-chain amino acids, Krebs cycle intermediates and metabolites from different catabolic pathways were more abundant in pHu+. In conclusion, the characterization of the main nutrient sources for embryos and now allantoic fluids provided an overview of the *in ovo* nutritional environment of pHu lines. Moreover, this study revealed the establishment, as early as day 10 of embryo development, of specific metabolic signatures in the allantoic fluid of pHu+ and pHu− lines.

During the incubation period (21 days in chickens), the embryo depends essentially on the nutrient content of the egg and its metabolism shifts in accordance with the type of substrate available and oxygen supply[1]. Access to O_2 fully supports the complete combustion of fatty acids, which are used as the primary source of energy for embryo development[2]. According to Nasir and Peebles[3], intensive selection for a high growth rate and muscle yield has changed the nutrient requirements of chicken embryos, with a potential imbalance between nutrient requirements and reserves. pHu+ and pHu− lines have been divergently selected based on the ultimate pH (pHu) of the meat, a proxy for muscle glycogen reserves[4]. The effects of this selection on broiler metabolism have been studied at 6 weeks of age through the quantification of muscle and serum metabolites by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy[5]. Chickens with low muscle pHu (pHu−) and high glycogen reserves are characterized by an over-representation of carbohydrate-related metabolites in serum and muscle, while chickens with high muscle pHu (pHu +) and low glycogen reserves exhibit markers of oxidative stress, muscle proteolysis, amino acid catabolism and β-oxidation. A liquid chromatography–mass spectrometry approach performed on 17-day-old animals also revealed different blood lipidomic signatures between the two divergent lines[6]. Glycerolipids (involved in energy storage) and ceramides were in higher concentrations in the blood of pHu− birds, whereas glycerophospholipids and sterols were more abundant in pHu+. Finally, it has been shown that differences between lines related to protein and energy metabolism are established from hatching[7].

To understand the metabolic orientation of embryos and the potential link with *in ovo* nutrient availability, the metabolome of the yolk and amniotic fluid was studied in pHu− and pHu+ lines before incubation (E0) and at day 10 of embryo development (E10)[8]. Metabolomic analysis of these two compartments revealed differences in metabolite composition and abundance in embryonated eggs of pHu+ and pHu− lines, which may explain subsequent metabolic and developmental specificities. To further describe the nutritional environment of the

[1]INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly, France. [2]INSERM, Université de Tours, iBrain, 37000 Tours, France. ✉email: sonia.metayer-coustard@inrae.fr

embryos, the present study investigated the metabolic composition of the allantoic fluid of both lines during development. Indeed, the allantoic fluid can store nitrogenous waste products, free amino acids and other important compounds for late embryo nutrition[9–11].

Allantois of the chick embryo appears at about 3 days of incubation as an evagination of the gut wall. Soon after its appearance, a branched network of capillaries is formed. It receives blood via the allantoic arteries and returns it to the body via the allantoic veins. Several studies revealed that the blood, allantoic and amniotic fluid of chicken embryos, which are separated from each other by complex and specific barriers, contain many amino acids and related compounds[12,13]. According to Da silva et al.[10], some nutrients, such as proteins and peptides, secreted into the allantoic fluid can be digested to provide free amino acids, which can be reabsorbed by the allantoic membrane and redirected to the embryo via the chorioallantoic capillary plexus. Since the allantoic fluid pH decreases in the last stages of development to reach intestinal pH values, optimal conditions can be found in the allantois for protein pre-digestion (activation of proteases).

To assess the developmental patterns of pHu+ and pHu− metabolism during embryogenesis, a metabolomic analysis by ^{1}H-NMR spectroscopy was conducted on allantoic fluids at E10, E14 and E17. These stages were chosen according to the availability of substrates in the eggs and the literature on embryo development and metabolism[1,2,14–16]. At E10, yolk lipids are used as the main energy substrate. The stage E14 is characterized by the complete differentiation of the chorioallantoic membrane, an intensification of nutrient transfers to the embryonic tissues (e.g., lipids), the opening of the sero-amniotic connection allowing the albumen to enter the amniotic cavity and by a rapid growth of the embryos. At E17, nutrient sources diversify, the growth rate decreases and the embryo prepares to hatch. The objective was to obtain indirect indicators from the metabolic status of the embryos and to determine the stage at which metabolic orientation was established in the two divergent lines.

Results

Description of the metabolomes obtained at E10, E14 and E17. To characterize the metabolic profiles of pHu− and pHu+ lines and their evolution during embryogenesis, we analyzed the allantoic fluid by ^{1}H-NMR spectroscopy at E10, E14 and E17. Figure 1 summarizes the metabolites found in yolk, amniotic fluid and allantoic fluid[8]. Forty distinct metabolites were identified in the allantoic fluid of the pHu lines (Table 1; representative NMR spectra in supplementary Fig. 1). Among these 40 metabolites, 18 were common to all 3 compartments, 5 were present in both yolk and allantoic fluid (glutamate, glycine, glucose, mannose, fumarate), and 8 were present in both amniotic fluid and allantoic fluid (creatine, inosine, cytidine, dimethylamine, dimethylsulfone, pyruvate, 2-hydroxy(HO)butyrate, 3-methyl-2-oxovalerate). Nine metabolites were found only in the allantoic fluid (uracil, xanthosine, urocanate, kynurenine, 3-HOkynurenine, nicotinate, cis-aconitate, 3-HOisobutyrate, 2-HOisovalerate). Pyroglutamate, pantothenate, 3-indoxylsulfate, aspartate, asparagine and threonine were specific to the yolk while isobutyrate and acetate were specific to amniotic fluid.

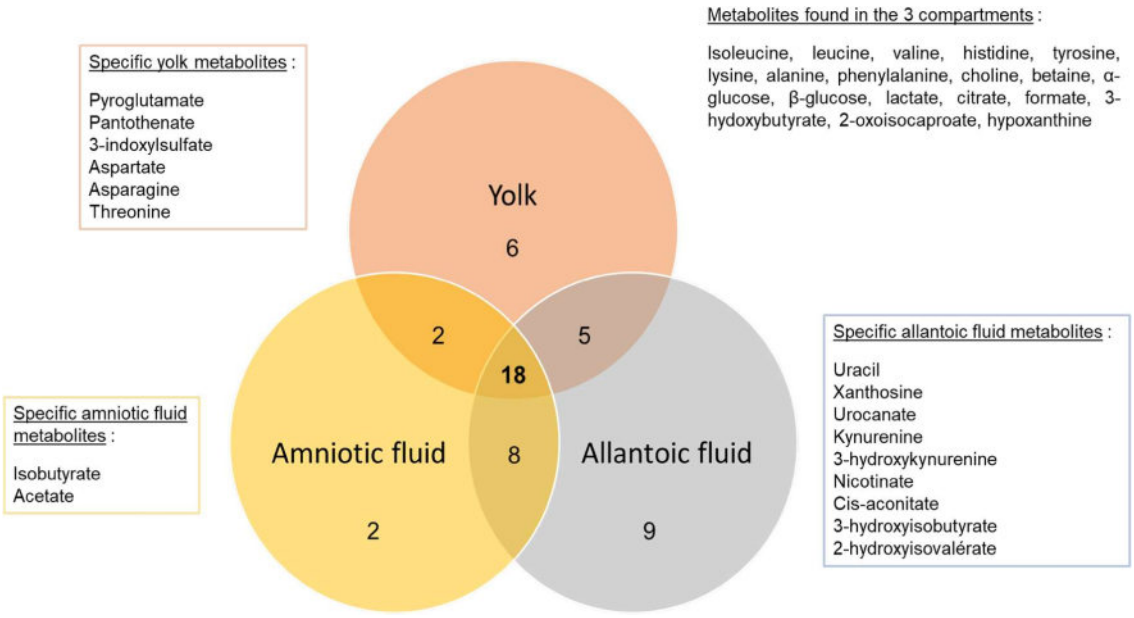


Figure 1. Venn diagram representing metabolites present in allantoic fluid (present study), yolk and amniotic fluid[8]. It compiles metabolites analyzed on the 10th day of incubation (E10) in the amniotic fluid, E0 (before incubation) and E10 in the yolk, and E10, E14 and E17 in the allantoic fluid. Metabolic profile analysis identified 31 metabolites in yolk, 30 in amniotic fluid and 40 in allantoic fluid referenced in the databases. Of the 40 metabolites identified in the allantoic fluid, 18 were common to all 3 compartments, 5 were present in both yolk and allantoic fluid, and 8 were present in both amniotic fluid and allantoic fluid. Specific metabolites of the yolk (n = 6), amniotic fluid (n = 2) and allantoic fluid (n = 9) are specified in the colored boxes (in orange, yellow and gray, respectively).

Classes	Metabolites pHu+	E10	E14	E17	Fold change E17/E10	Fold change E17/E14
Amino acids, peptides, and analogues	Alanine-148	0.282 ± 0.019^{b}	0.216 ± 0.022^{b}	0.723 ± 0.047^{a}	2.6	3.3
	Betaine-327	2.222 ± 0.088^{b}	4.568 ± 0.294^{b}	17.029 ± 3.618^{a}	**7.7**	3.7
	Betaine-390	0.606 ± 0.023^{b}	1.092 ± 0.061^{b}	4.528 ± 0.779^{a}	**7.5**	4.1
	Creatine-304	0.417 ± 0.011^{c}	0.946 ± 0.079^{b}	3.478 ± 0.300^{a}	**8.3**	3.7
	Creatine-393	0.354 ± 0.010^{c}	0.811 ± 0.059^{b}	2.780 ± 0.211^{a}	**7.9**	3.4
	Glutamate-213	0.656 ± 0.042^{b}	0.841 ± 0.063^{b}	2.608 ± 0.134^{a}	4.0	3.1
	Glutamate-245	0.647 ± 0.035^{c}	0.913 ± 0.074^{b}	2.364 ± 0.103^{a}	3.7	2.6
	Glycine-356	0.263 ± 0.008^{b}	0.530 ± 0.042^{b}	2.579 ± 0.734^{a}	**9.8**	4.9
	Histidine-705	0.106 ± 0.011^{b}	0.125 ± 0.010^{b}	0.655 ± 0.073^{a}	**6.2**	**5.2**
	Isoleucine-101	0.052 ± 0.003^{b}	0.054 ± 0.005^{b}	0.136 ± 0.010^{a}	2.6	2.5
	Leucine-096	0.089 ± 0.006^{b}	0.077 ± 0.009^{b}	0.221 ± 0.019^{a}	2.5	2.9
	Lysine-173	1.304 ± 0.073^{b}	1.340 ± 0.130^{b}	4.340 ± 0.268^{a}	3.3	3.2
	Lysine-302	0.665 ± 0.045^{b}	0.644 ± 0.064^{b}	1.957 ± 0.147^{a}	2.9	3.0
	Phenylalanine-738	0.179 ± 0.011^{a}	0.019 ± 0.002^{c}	0.053 ± 0.003^{b}	0.3	2.8
	Tyrosine-690	0.140 ± 0.014^{b}	0.201 ± 0.021^{b}	0.617 ± 0.057^{a}	4.4	3.1
	Tyrosine-719	0.133 ± 0.013^{b}	0.178 ± 0.021^{b}	0.454 ± 0.031^{a}	3.4	2.6
	Valine-099	0.057 ± 0.003^{b}	0.077 ± 0.008^{b}	0.194 ± 0.013^{a}	3.4	2.5
	Valine-104	0.059 ± 0.003^{b}	0.077 ± 0.009^{b}	0.178 ± 0.014^{a}	3.0	2.3
Carbohydrates and conjugates	α-glucose-524	0.918 ± 0.080^{a}	0.831 ± 0.148^{a}	0.851 ± 0.222^{a}	0.9	1.0
	β-glucose-465	1.332 ± 0.117^{b}	1.399 ± 0.220^{b}	2.641 ± 0.354^{a}	2.0	1.9
	Glucose-341	2.901 ± 0.219^{b}	2.979 ± 0.417^{b}	4.840 ± 0.610^{a}	1.7	1.6
	Glucose-389	0.814 ± 0.065^{b}	0.841 ± 0.116^{b}	1.477 ± 0.179^{a}	1.8	1.8
	Glucose-391	0.645 ± 0.051^{b}	0.696 ± 0.092^{b}	1.231 ± 0.141^{a}	1.9	1.8
	Mannose-519	0.095 ± 0.007^{b}	0.259 ± 0.017^{b}	0.812 ± 0.113^{a}	**8.5**	3.1
Carboxylic acids and derivatives	Cis-aconitate-566	0.029 ± 0.001^{b}	0.062 ± 0.004^{b}	0.479 ± 0.022^{a}	*16.5*	**7.7**
	Citrate-254	1.497 ± 0.068^{b}	1.788 ± 0.099^{b}	4.032 ± 0.340^{a}	2.7	2.3
	Formate-845	0.153 ± 0.009^{a}	0.197 ± 0.015^{a}	0.089 ± 0.024^{b}	0.6	0.5
	Fumarate-652	0.013 ± 0.001^{b}	0.020 ± 0.003^{a}	0.020 ± 0.002^{a}	1.5	1.0
Hydroxy acids and derivatives	2-HObutyrate-090	0.055 ± 0.004^{a}	0.050 ± 0.006^{a}	ND		
	3-HObutyrate-120	3.678 ± 0.278^{b}	7.880 ± 1.370^{a}	7.906 ± 2.194^{a}	2.1	1.0
	3-HObutyrate-230	1.391 ± 0.101^{b}	2.984 ± 0.494^{a}	3.610 ± 0.788^{a}	2.6	1.2
	3-HObutyrate-241	1.665 ± 0.112^{b}	3.362 ± 0.523^{a}	4.441 ± 0.832^{a}	2.7	1.3
	3-HObutyrate-416	1.229 ± 0.085^{b}	2.656 ± 0.396^{a}	3.347 ± 0.635^{a}	2.7	1.3
	3-HOisobutyrate-107	0.291 ± 0.016^{a}	0.418 ± 0.070^{a}	0.392 ± 0.093^{a}	1.3	0.9
	Lactate-411	1.301 ± 0.111^{b}	0.824 ± 0.118^{c}	1.996 ± 0.137^{a}	1.5	2.4
Nucleosides, nucleotides, and analogues	Xanthosine-585	0.028 ± 0.001^{c}	0.085 ± 0.006^{b}	0.288 ± 0.015^{a}	*10.3*	3.4
	Cytidine-606	0.050 ± 0.003^{b}	0.087 ± 0.011^{b}	0.377 ± 0.030^{a}	**7.5**	4.3
	Inosine-609	0.034 ± 0.002^{b}	0.045 ± 0.004^{b}	0.112 ± 0.008^{a}	3.3	2.5
	Inosine-823	0.033 ± 0.002^{b}	0.046 ± 0.005^{b}	0.101 ± 0.008^{a}	3.1	2.2
	Inosine-833	0.037 ± 0.002^{b}	0.067 ± 0.006^{b}	0.235 ± 0.017^{a}	**6.4**	3.5
Pyrimidines and derivatives	Uracil-580	0.055 ± 0.002^{c}	0.156 ± 0.009^{b}	0.557 ± 0.033^{a}	*10.1*	3.6
	Uracil-754	0.030 ± 0.001^{b}	0.063 ± 0.003^{a}	ND		
Purines and derivatives	Hypoxanthine-819	0.058 ± 0.001^{c}	0.124 ± 0.008^{b}	0.460 ± 0.032^{a}	**7.9**	3.7
Keto acids and derivatives	Pyruvate-237	0.330 ± 0.026^{b}	0.267 ± 0.030^{b}	0.516 ± 0.052^{a}	1.6	1.9
	2-oxoisocaproate-093	0.077 ± 0.004^{c}	0.221 ± 0.024^{b}	0.632 ± 0.066^{a}	**8.2**	2.9
	2-oxoisocaproate-095	0.052 ± 0.004^{a}	0.058 ± 0.006^{a}	ND		
	2-oxoisocaproate-261	0.050 ± 0.002^{b}	0.060 ± 0.005^{b}	0.194 ± 0.009^{a}	3.9	3.2
Fatty acid esters	2-HOisovalerate-084	0.024 ± 0.001^{b}	0.023 ± 0.002^{b}	0.042 ± 0.002^{a}	1.8	1.8
	3-methyl-2-oxovalerate-110	0.131 ± 0.008^{b}	0.199 ± 0.029^{b}	0.290 ± 0.045^{a}	2.2	1.5
Organic nitrogen compounds	O-Phosphocholine-322	0.442 ± 0.023^{b}	0.596 ± 0.049^{b}	1.232 ± 0.125^{a}	2.8	2.1
	Choline-320	0.401 ± 0.024^{c}	0.766 ± 0.050^{b}	1.768 ± 0.197^{a}	4.4	2.3
Carbonyl compounds	Kynurenine-680	ND	0.181 ± 0.016^{b}	1.405 ± 0.135^{a}		**7.8**
	Kynurenine-686	ND	0.240 ± 0.020^{b}	1.688 ± 0.174^{a}		**7.0**
	Kynurenine-740	ND	0.204 ± 0.015^{b}	1.415 ± 0.114^{a}		**6.9**
	3-HOkynurenine-669	ND	0.050 ± 0.004^{b}	0.578 ± 0.056^{a}		*11.6*
	3-HOkynurenine-747	ND	0.068 ± 0.006^{b}	0.689 ± 0.063^{a}		*10.1*

Continued

Classes	Metabolites pHu+	E10	E14	E17	Fold change E17/E10	Fold change E17/E14
Pyridines and derivatives	Nicotinate-825	0.013 ± 0.001	ND	ND		
	Nicotinate-861	0.010 ± 0.001	ND	ND		
	Nicotinate-894	0.009 ± 0.001	ND	ND		
Imidazoles	Urocanate-637	ND	0.008 ± 0.001^{b}	0.066 ± 0.011^{a}		**8.3**
	Urocanate-640	ND	0.006 ± 0.001^{b}	0.060 ± 0.012^{a}		*10.0*
Amines	Dimethylamine-272	0.096 ± 0.015^{b}	0.454 ± 0.057^{b}	2.066 ± 0.285^{a}	*21.5*	4.6
Sulfones	Dimethylsulfone-315	0.215 ± 0.020^{b}	0.285 ± 0.018^{b}	0.707 ± 0.064^{a}	3.3	2.5
Others	3-methyl-2-oxovalerate + Pantothenate-089	0.078 ± 0.004^{c}	0.229 ± 0.024^{b}	0.598 ± 0.052^{a}	**7.7**	2.6
	Acetate + Lysine-191	1.831 ± 0.090^{b}	2.048 ± 0.185^{b}	6.375 ± 0.323^{a}	3.5	3.1
	Lactate + Threonine-133	3.913 ± 0.361^{c}	2.500 ± 0.369^{b}	8.171 ± 0.452^{a}	2.1	3.3
	Uridine-Cytidine-591	0.194 ± 0.015^{b}	0.346 ± 0.044^{b}	0.983 ± 0.111^{a}	**5.1**	2.8

Table 1. List of metabolites identified at E10, E14 and E17 in the allantoic fluid of pHu+ eggs. Values are means expressed in arbitrary units (area/TSP area) ± S.E.M. Italics and bold indicate metabolites that increase significantly between E10 and E17, and between E14 and E17 with a fold change greater than or equal to 10 and 5, respectively. Underline indicate metabolites that decrease significantly in concentration (fold change less than 1). The stage effect was analyzed by ANOVA while the means were compared with a Student's t test ($P \leq 0.05$). ^{a,b,c} Values without a common letter are significantly different. ND: not detected. The class named "others" was not considered in the identification of the individual metabolites because there are spectral areas where some molecules overlap.

A total of 37, 39 and 38 metabolites were identified in the allantoic fluid of the pHu lines at E10, E14 and E17, respectively (Tables 1 and 2). The results indicated a disappearance of nicotinate between E10 and E14 and of 2-HObutyrate between E14 and E17, while kynurenine, 3-HOkynurenine, and urocanate were detected in the allantoic fluid only at E14. Analysis of the metabolic profiles also indicated a significant increase in most metabolites during development, either between E10 and E17 or between E14 and E17. This increase was particularly pronounced for glycine in pHu−, xanthosine in pHu+, cis-aconitate, uracil, 3-HOkynurenine, urocanate and dimethylamine in both lines (fold change ≥ 10) and to a lesser extent for tyrosine and xanthosine in pHu−, betaine and glycine in pHu+, creatine, histidine, mannose, cytidine, inosine, hypoxanthine, 2-oxoisocaproate and kynurenine in both lines (fold change ≥ 5). Only formate, lactate and phenylalanine showed different profiles. Formate abundance decreased significantly between E14 and E17, while lactate (at least in pHu +) and phenylalanine abundance decreased between E10 and E14 and then increased until E17. Finally, some of the metabolites such as betaine, histidine, isoleucine, lysine, valine, glucose, etc. accumulated more rapidly in the allantoic fluid of pHu− than in pHu+ (between E10 and E14).

Multivariate analysis of allantoic fluid spectral data. The OPLS-DA performed on ^{1}H-NMR spectral data was used to visualize differences in the metabolic profiles of pHu+ and pHu− lines at E10, E14 and E17 (Fig. 2A) and the distribution of the 64 variables contributing to the model (Fig. 2B). The score plot showed a clear separation between the E10, E14 and E17 stages, meaning that the stage effect was greater than the line effect. Moreover, we observed an increase in the variability of the metabolome during embryonic development. Indeed, the samples collected at E17 were more scattered compared to those of the E10 and E14 stages (Fig. 2A). In the loading plot, most metabolites were associated with the E17 stage (Fig. 2B), likely reflecting the gradual accumulation of these metabolites during embryo development (Table 1).

At E10, the model adjusted from the metabolome of both lines was composed of 1 predictive and 4 orthogonal components (Fig. 3A). It included 18 variables representing 16 metabolites (Fig. 3B). It explained 92% of the variation between the 2 groups (R^2Y) and clearly discriminated the pHu+ and pHu− lines. The reliability of this model was assessed by CV-ANOVA ($P = 5.1e\text{-}05$) and the predictive ability Q^2 was 0.81. The importance of the metabolites in the model and their contribution are presented in Fig. 3B. Of the 16 metabolites, 8 had an importance in the model (VIP) greater than 1 (hypoxanthine, isoleucine, leucine, cytidine, uridine-cytidine, creatine, choline and valine). Hypoxanthine was the most contributing variable in the model.

Among the 16 discriminating metabolites, we identified amino acids (glycine, tyrosine, isoleucine, leucine, valine, histidine), organic compounds (dimethylamine), vitamins (nicotinate, choline), sugars (mannose), Krebs cycle intermediates (fumarate), metabolites related to purines and pyrimidines (uridine, cytidine, hypoxanthine) and muscle metabolism (creatine). The 3-HOisobutyrate, resulting from the partial degradation of branched chain amino acids (mainly valine), was also discriminant between both lines. Choline, creatine, glycine, 3-HOisobutyrate, hypoxanthine and nicotinate were more abundant in the allantoic fluid of pHu−, while cytidine, dimethylamine, fumarate, histidine, isoleucine, leucine, mannose, tyrosine and valine were more abundant in the pHu+ line.

At E14, the model adjusted from the metabolome of both lines was composed of 1 predictive and 1 orthogonal component (Fig. 4A). It included 14 variables representing 12 metabolites (Fig. 4B). It explained 68% of the variation between the 2 groups (R^2Y) and clearly discriminated the pHu+ and pHu− lines. The reliability of this model was assessed by CV-ANOVA ($P = 0.00027$), and the predictive ability (Q^2) was 0.56. The importance of the metabolites in the model and their contribution are presented in Fig. 4B. Of the 12 metabolites, 6 had

Classes	Metabolites pHu–	E10	E14	E17	Fold change E17/E10	Fold change E17/E14
Amino acids, peptides, and analogues	Alanine-148	0.254 ± 0.024^{b}	0.310 ± 0.022^{b}	0.628 ± 0.040^{a}	2.5	2.0
	Betaine-327	2.483 ± 0.151^{c}	5.609 ± 0.381^{b}	10.585 ± 1.447^{a}	4.3	1.9
	Betaine-390	0.652 ± 0.037^{c}	1.332 ± 0.085^{b}	3.054 ± 0.364^{a}	4.7	2.3
	Creatine-304	0.458 ± 0.016^{c}	1.194 ± 0.067^{b}	3.686 ± 0.467^{a}	**8.0**	3.1
	Creatine-393	0.376 ± 0.014^{c}	1.023 ± 0.052^{b}	2.914 ± 0.322^{a}	**7.8**	2.8
	Glutamate-213	0.620 ± 0.052^{c}	1.252 ± 0.050^{b}	2.600 ± 0.184^{a}	4.2	2.1
	Glutamate-245	0.613 ± 0.050^{c}	1.268 ± 0.051^{b}	2.223 ± 0.154^{a}	3.6	1.8
	Glycine-356	0.273 ± 0.013^{b}	0.794 ± 0.038^{b}	2.789 ± 1.079^{a}	*10.2*	3.5
	Histidine-705	0.089 ± 0.011^{c}	0.203 ± 0.021^{b}	0.760 ± 0.068^{a}	**8.5**	3.7
	Isoleucine-101	0.042 ± 0.004^{c}	0.072 ± 0.006^{b}	0.144 ± 0.014^{a}	3.4	2.0
	Leucine-096	0.069 ± 0.007^{b}	0.103 ± 0.011^{b}	0.219 ± 0.023^{a}	3.2	2.1
	Lysine-173	1.238 ± 0.104^{c}	2.039 ± 0.135^{b}	3.618 ± 0.180^{a}	2.9	1.8
	Lysine-302	0.609 ± 0.054^{c}	0.948 ± 0.074^{b}	1.490 ± 0.102^{a}	2.4	1.6
	Phenylalanine-738	0.175 ± 0.011^{a}	0.022 ± 0.002^{c}	0.059 ± 0.006^{b}	0.3	2.7
	Tyrosine-690	0.115 ± 0.012^{c}	0.277 ± 0.023^{b}	0.663 ± 0.075^{a}	**5.8**	2.4
	Tyrosine-719	0.110 ± 0.011^{c}	0.240 ± 0.021^{b}	0.422 ± 0.039^{a}	3.8	1.8
	Valine-099	0.049 ± 0.004^{c}	0.105 ± 0.008^{b}	0.205 ± 0.019^{a}	4.2	2.0
	Valine-104	0.052 ± 0.004^{c}	0.104 ± 0.007^{b}	0.185 ± 0.018^{a}	3.6	1.8
Carbohydrates and conjugates	α-glucose-524	0.786 ± 0.098^{b}	1.182 ± 0.148^{b}	1.707 ± 0.288^{a}	2.2	1.4
	β-glucose-465	1.134 ± 0.145^{c}	2.003 ± 0.217^{b}	4.063 ± 0.505^{a}	3.6	2.0
	Glucose-341	2.563 ± 0.282^{c}	4.216 ± 0.399^{b}	6.854 ± 0.844^{a}	2.7	1.6
	Glucose-389	0.710 ± 0.080^{c}	1.163 ± 0.115^{b}	2.074 ± 0.262^{a}	2.9	1.8
	Glucose-391	0.569 ± 0.063^{c}	0.953 ± 0.091^{b}	1.713 ± 0.212^{a}	3.0	1.8
	Mannose-519	0.083 ± 0.009^{c}	0.316 ± 0.024^{b}	0.736 ± 0.097^{a}	**8.9**	2.3
Carboxylic acids and derivatives	Cis-aconitate-566	0.030 ± 0.002^{c}	0.070 ± 0.004^{b}	0.475 ± 0.018^{a}	*15.8*	**6.8**
	Citrate-254	1.541 ± 0.057^{c}	2.327 ± 0.162^{b}	3.080 ± 0.308^{a}	2.0	1.3
	Formate-845	0.147 ± 0.011^{a}	0.125 ± 0.016^{a}	0.065 ± 0.011^{b}	0.4	0.5
	Fumarate-652	0.012 ± 0.001^{b}	0.022 ± 0.003^{a}	0.014 ± 0.002^{b}	1.2	0.6
Hydroxy acids and derivatives	2-HObutyrate-090	0.046 ± 0.006^{a}	0.054 ± 0.006^{a}	ND		
	3-HObutyrate-120	3.392 ± 0.298^{b}	7.968 ± 1.486^{a}	4.043 ± 1.028^{b}	1.2	0.5
	3-HObutyrate-230	1.287 ± 0.109^{b}	3.071 ± 0.531^{a}	2.217 ± 0.349^{ab}	1.7	0.7
	3-HObutyrate-241	1.559 ± 0.127^{b}	3.526 ± 0.563^{a}	2.938 ± 0.420^{a}	1.9	0.8
	3-HObutyrate-416	1.162 ± 0.087^{b}	2.809 ± 0.438^{a}	2.282 ± 0.290^{a}	2.0	0.8
	3-HOisobutyrate-107	0.298 ± 0.023^{b}	0.479 ± 0.076^{a}	0.309 ± 0.068^{ab}	1.0	0.6
	Lactate-411	1.133 ± 0.156^{b}	0.977 ± 0.113^{b}	1.829 ± 0.145^{a}	1.6	1.9
Nucleosides, nucleotides, and analogues	Xanthosine-585	0.028 ± 0.001^{c}	0.114 ± 0.004^{b}	0.274 ± 0.013^{a}	**9.8**	2.4
	Cytidine-606	0.040 ± 0.004^{c}	0.080 ± 0.006^{b}	0.288 ± 0.016^{a}	**7.2**	3.6
	Inosine-609	0.035 ± 0.003^{c}	0.058 ± 0.005^{b}	0.093 ± 0.006^{a}	2.7	1.6
	Inosine-823	0.033 ± 0.003^{c}	0.058 ± 0.005^{b}	0.097 ± 0.008^{a}	2.9	1.7
	Inosine-833	0.038 ± 0.003^{c}	0.086 ± 0.005^{b}	0.228 ± 0.016^{a}	**6.0**	2.7
Pyrimidines and derivatives	Uracil-580	0.055 ± 0.003^{c}	0.217 ± 0.008^{b}	0.550 ± 0.024^{a}	*10.0*	2.5
	Uracil-754	0.034 ± 0.002^{b}	0.103 ± 0.010^{a}	ND		
Purines and derivatives	Hypoxanthine-819	0.069 ± 0.003^{c}	0.178 ± 0.013^{b}	0.519 ± 0.070^{a}	**7.5**	2.9
Keto acids and derivatives	Pyruvate-237	0.285 ± 0.030^{b}	0.311 ± 0.037^{b}	0.454 ± 0.037^{a}	1.6	1.5
	2-oxoisocaproate-093	0.070 ± 0.005^{c}	0.228 ± 0.022^{b}	0.544 ± 0.062^{a}	**7.8**	2.4
	2-oxoisocaproate-095	0.045 ± 0.005^{b}	0.067 ± 0.005^{a}	ND		
	2-oxoisocaproate-261	0.044 ± 0.004^{c}	0.072 ± 0.004^{b}	0.202 ± 0.019^{a}	4.6	2.8
Fatty acid esters	2-HOisovalerate-084	0.023 ± 0.002^{b}	0.026 ± 0.002^{b}	0.040 ± 0.002^{a}	1.7	1.5
	3-methyl-2-oxovalerate-110	0.118 ± 0.010^{b}	0.222 ± 0.032^{a}	0.264 ± 0.035^{a}	2.2	1.2
Organic nitrogen compounds	O-Phosphocholine-322	0.414 ± 0.021^{c}	0.801 ± 0.065^{b}	1.359 ± 0.141^{a}	3.3	1.7
	Choline-320	0.467 ± 0.029^{c}	0.967 ± 0.082^{b}	1.554 ± 0.198^{a}	3.3	1.6
Carbonyl compounds	Kynurenine-680	ND	0.238 ± 0.022^{b}	1.671 ± 0.199^{a}		**7.0**
	Kynurenine-686	ND	0.318 ± 0.027^{b}	1.901 ± 0.215^{a}		**6.0**
	Kynurenine-740	ND	0.272 ± 0.021^{b}	1.883 ± 0.232^{a}		**6.9**
	3-HOkynurenine-669	ND	0.064 ± 0.004^{b}	0.648 ± 0.070^{a}		*10.1*
	3-HOkynurenine-747	ND	0.090 ± 0.006^{b}	0.762 ± 0.078^{a}		**8.5**

Continued

Classes	Metabolites pHu−	E10	E14	E17	Fold change E17/E10	Fold change E17/E14
Pyridines and derivatives	Nicotinate-825	0.016 ± 0.001	ND	ND		
	Nicotinate-861	0.012 ± 0.001	ND	ND		
	Nicotinate-894	0.010 ± 0.001	ND	ND		
Imidazoles	Urocanate-637	ND	0.009 ± 0.001^{b}	0.105 ± 0.033^{a}		*11.7*
	Urocanate-640	ND	0.007 ± 0.001^{b}	0.100 ± 0.034^{a}		*14.3*
Amines	Dimethylamine-272	0.070 ± 0.008^{c}	0.585 ± 0.067^{b}	2.684 ± 0.338^{a}	*38.3*	4.6
Sulfones	Dimethylsulfone-315	0.223 ± 0.024^{c}	0.342 ± 0.028^{b}	0.586 ± 0.066^{a}	2.6	1.7
Others	3-methyl-2-oxovalerate + Pantothenate-089	0.075 ± 0.004^{c}	0.242 ± 0.025^{b}	0.512 ± 0.061^{a}	**6.8**	2.1
	Acetate + Lysine-191	1.816 ± 0.143^{c}	3.074 ± 0.164^{b}	5.637 ± 0.280^{a}	3.1	1.8
	Lactate + Threonine-133	3.385 ± 0.524^{b}	3.137 ± 0.336^{b}	7.662 ± 0.568^{a}	2.3	2.4
	Uridine-Cytidine-591	0.156 ± 0.014^{c}	0.380 ± 0.028^{b}	0.653 ± 0.050^{a}	4.2	1.7

Table 2. List of metabolites identified at E10, E14 and E17 in the allantoic fluid of pHu− eggs. Values are means expressed in arbitrary units (area/TSP area) ± S.E.M. Italics and bold indicate metabolites that increase significantly between E10 and E17, and between E14 and E17 with a fold change greater than or equal to 10 and 5, respectively. Underline indicate metabolites that decrease significantly in concentration (fold change less than 1). The stage effect was analyzed by ANOVA while the means were compared with a Student's t test ($P \leq 0.05$). ^{a,b,c}Values without a common letter are significantly different. ND: not detected. The class named "others" was not considered in the identification of the individual metabolites because there are spectral areas where some molecules overlap.

an importance in the model (VIP) greater than 1 (glutamate, uracil, xanthosine, glycine, hypoxanthine and acetate + lysine). Formate, glutamate, glycine, hypoxanthine, uracil and xanthosine were the most contributing variables in the model.

Among the 12 discriminating metabolites, we identified amino acids and derivatives (2-oxoisocaproate, glycine, glutamate and kynurenine), organic compounds (dimethylsulfone), metabolites related to purines and pyrimidines (uracil, xanthosine and hypoxanthine), and metabolites involved in one-carbon metabolism (formate, choline). Most of them (choline, dimethylsulfone, 2-oxoisocaproate, glutamate, glycine, hypoxanthine, kynurenine, uracil and xanthosine) were overrepresented in the allantoic fluid of pHu−. Only formate was more abundant in the pHu+ line.

At E17, the model adjusted from the metabolome of both lines was composed of 1 predictive and 1 orthogonal component (Fig. 5A). It included 35 variables representing 25 metabolites (Fig. 5B). It explained 70% of the variation between the 2 groups (R^2Y) and clearly discriminated the pHu+ and pHu− lines. The reliability of this model was assessed by CV-ANOVA ($P = 0.0022$), and the predictive ability (Q^2) was 0.55. The importance of the metabolites in the model and their contribution are presented in Fig. 5B. Of the 25 metabolites, 12 had an importance in the model (VIP) greater than 1 (α glucose, β glucose, glucose, uridine-cytidine, 3-HObutyrate, lysine, 3-HOisobutyrate, citrate, inosine, 3-methyl-2-oxovalerate, cytidine and kynurenine). Cytidine, glucose and lysine were the most contributing variables in the model.

Among the 25 discriminating metabolites, we identified amino acids and derivatives (3-HObutyrate, 3-HOisobutyrate, alanine, lysine, isoleucine, kynurenine, phenylalanine and urocanate), metabolites related to purines and pyrimidines (inosine, cytidine), organic compounds (3-methyl-2-oxovalerate, dimethylamine, dimethylsulfone and lactate), sugars (glucose), Krebs cycle intermediates (citrate, fumarate) and formate, a one-carbon metabolism intermediate. Betaine was considered a methyl group donor and organic osmolyte, but O-phosphocholine, an intermediate in the biosynthesis of phosphatidylcholine, was also detected. Glucose, dimethylamine, isoleucine, kynurenine, O-phosphocholine, phenylalanine and urocanate were overrepresented in the allantoic fluid of pHu−, while 3-HObutyrate, 3-HOisobutyrate, 3-methyl-2-oxovalerate, alanine, betaine, citrate, cytidine, dimethylsulfone, formate, fumarate, inosine, lactate, lysine and uridine-cytidine were overrepresented in the pHu+ line.

Discussion

Because of the excellent reproducibility of ^{1}H-NMR spectroscopy, its quantitative accuracy and its ability to identify structures[17], this instrumental approach was of great interest to characterize the metabolome of different egg compartments such as yolk, amniotic fluid[8] and allantoic fluid.

In birds, the composition of allantoic fluid and its evolution during embryonic development are still poorly described. The OPLS-DA performed on the spectral dataset clearly identified three clusters highlighting differences in the metabolic profiles obtained at E10, E14 and E17, regardless of the line. It also revealed an increase in inter-individual variability during embryonic development. With the exception of formate, nicotinate and phenylalanine, all metabolites accumulated in the allantoic fluid, especially amino acids, peptides and analogues, the most represented class among those identified with 12 distinct metabolites (alanine, betaine, creatine, glutamate, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, tyrosine and valine). In addition to serving as building blocks for tissue protein synthesis, amino acids act as antioxidants, regulators of hormone secretion, major fuels for embryonic growth and cell signaling molecules. Amino acids are also essential precursors for the synthesis of non-protein substances with biological importance, including purine, pyrimidine nucleotides and

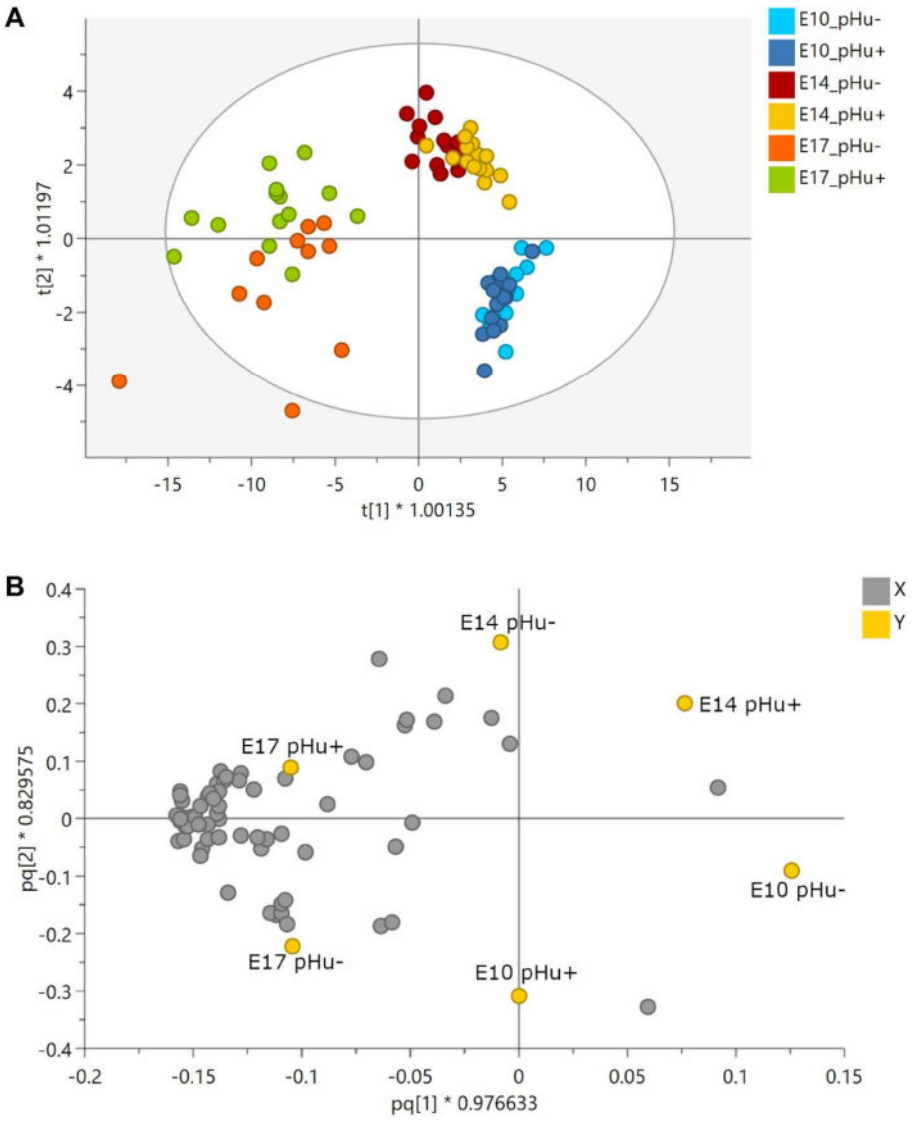


Figure 2. OPLS-DA score (**A**) and loading plot (**B**) based on the ^{1}H-NMR spectra of allantoic fluid samples from pHu+ and pHu− lines on days 10, 14 and 17 of incubation. The OPLS-DA score plot revealed clustering of samples by embryonic stage (n = 15 per line and per stage). $R^2Y = 0.50$, $Q^2 = 0.39$ and CV-ANOVA = 5.6e-11. The OPLS-DA loading plot represents the correlation structure of the metabolomic variables (X, gray circle) with the stage and line variables (Y, yellow circle). The loading plot revealed that most metabolites are highly correlated with the 17th day of incubation.

creatine[18]. Our results are in agreement with the increase in amino acid concentration in allantoic fluid from E13 to E18 observed by Zhu et al.[19]. Changes in relative metabolic contents during *in ovo* development (e.g., amino acids) reflect significant changes in embryo metabolism, transfers of compounds between egg compartments[13] or activation of proteases in relation to environmental acidification[10]. More generally, the accumulation mentioned above was particularly strong for some metabolites, with a fold change greater than 5. The classes mainly concerned with this high accumulation were amino acids, peptides and analogues, carbonyl compounds, and those related to purine metabolism (nucleotides, nucleosides, purines, pyrimidines).

Characterization of allantoic fluid in addition to yolk and amniotic fluid provided an overview of the nutritional environment of pHu+ and pHu− embryos[8]. Among the 40 metabolites identified in the allantoic fluid, 31 were present in the yolk and/or amniotic fluid. The 9 metabolites specifically identified in the allantoic fluid include several compounds involved in tryptophan metabolism (3-HOkynurenine, kynurenine, nicotinate), amino acid catabolism (urocanate, 3-HOisobutyrate, 2-HOisovalerate), Krebs cycle (cis-aconitate), and purine and pyrimidine metabolism (xanthosine and uracil).

Regardless of the stage (E10, E14 and E17), the OPLS-DA models based on the metabolome of the allantoic fluid of the two genetic lines divergently selected for high (pHu+) or low (pHu−) ultimate pH of the *Pectoralis major* muscle were strongly discriminant and revealed line-related differences in both energy metabolism and one-carbon and purine metabolism.

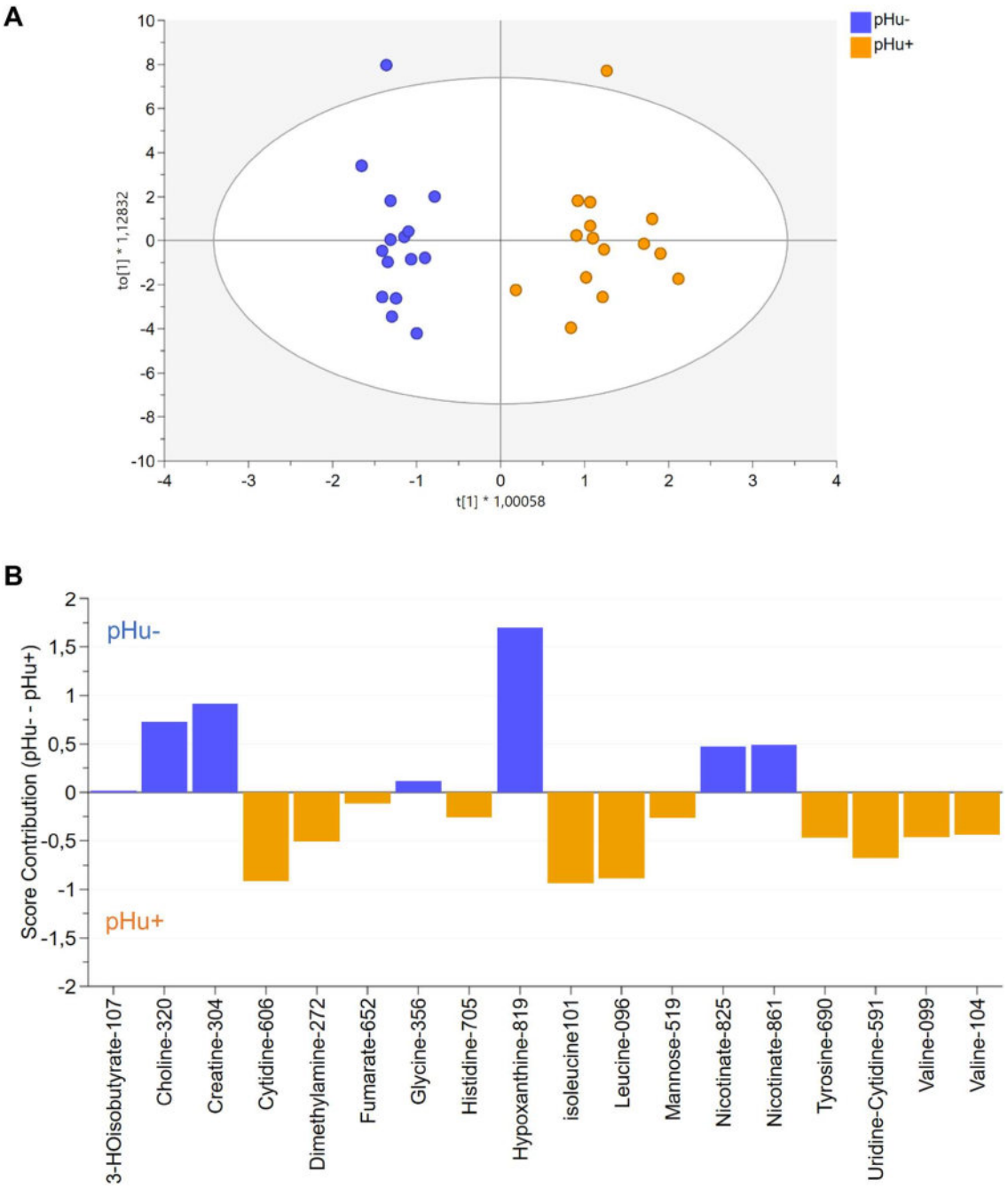


Figure 3. OPLS-DA score plot based on the ^{1}H-NMR spectra of allantoic fluid samples from pHu+ and pHu− lines (n = 15) on the 10th day of incubation (**A**). The OPLS-DA contribution plot indicates the contribution of discriminating variables in each line. Variables with positive contributions (blue bars) correspond to metabolites more abundant in pHu− line (e.g., choline, creatine). Variables with negative contributions (orange bars) correspond to metabolites more abundant in pHu+ line (e.g., cytidine, leucine). Variables with a strong contribution such as hypoxanthine in pHu− or isoleucine in pHu+ correspond to the most discriminating metabolites between the two lines. Metabolites were referenced by their names, followed by their chemical shift multiplied by 100 (**B**). $R^2Y = 0.92$, $Q^2 = 0.81$, CV-ANOVA = 5.1e-05 and X = 18.

At E10, the allantoic fluid of the pHu+ contained more branched amino acids (BCAAs), such as leucine, isoleucine and valine, than that of pHu−, which was also the case for some of them in the yolk and amniotic fluid[8]. Leucine was more abundant in the egg yolk of pHu+ at E0, while leucine and isoleucine were more abundant in the amniotic fluid at E10. Valine was specifically discriminant in the allantoic fluid and only at E10.

These differences disappeared at E14 but later in development (i.e., at E17), the allantoic fluid of the pHu+ contained more 3-HObutyrate, 3-methyl-2-oxovalerate and 3-HOisobutyrate. Metabolites resulting from the catabolism of BCAAs are converted into acetyl-CoA, which acts mainly as a substrate for the Krebs cycle. As

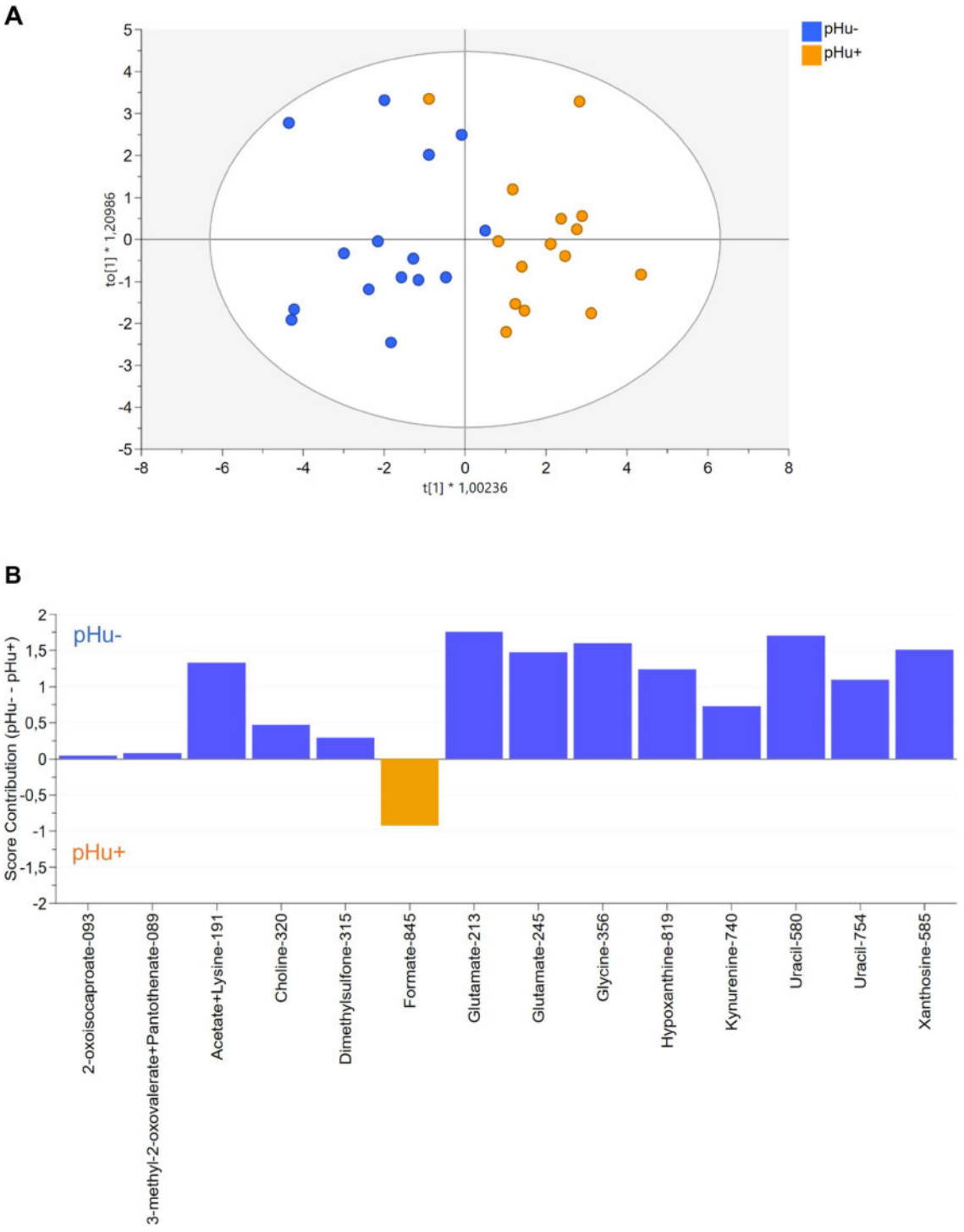


Figure 4. OPLS-DA score plot based on the ^{1}H-NMR spectra of allantoic fluid samples 4from pHu+ and pHu− lines (n = 15) on the 14th day of incubation (**A**). OPLS-DA contribution plot indicating the contribution of discriminating variables in each line. Variables with positive contributions (blue bars) correspond to metabolites more abundant in pHu− line (e.g., hypoxanthine, uracil). Variables with negative contributions (orange bars) correspond to metabolites more abundant in pHu+ line (e.g., formate). Variables with a strong contribution such as glutamate in pHu− correspond to the most discriminating metabolites between the two lines. Metabolites were referenced by their name, followed by their chemical shift multiplied by 100 (**B**). $R^2Y = 0.68$, $Q^2 = 0.56$, CV-ANOVA = 0.00027 and X = 14.

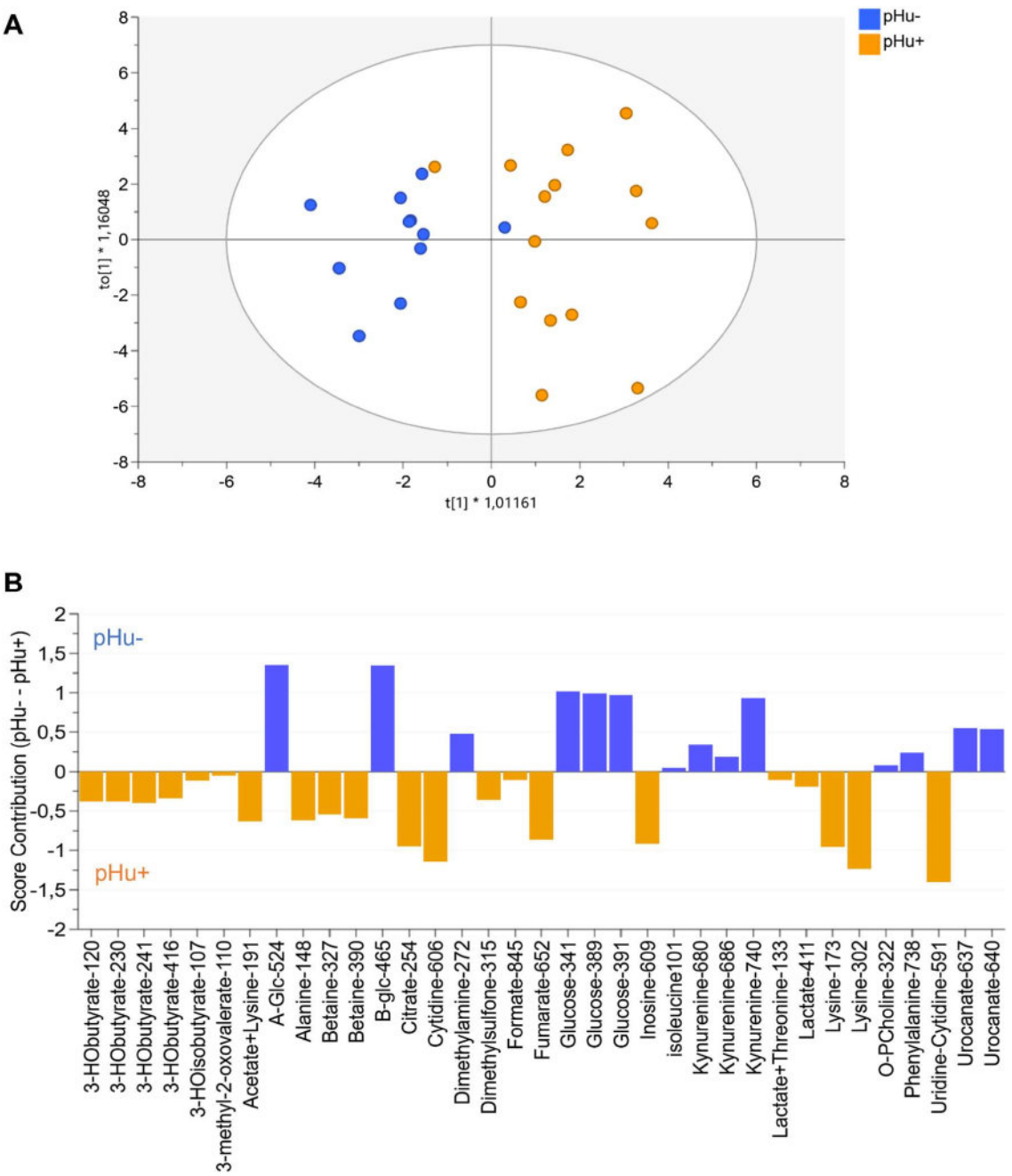


Figure 5. OPLS-DA score plot based on the ^{1}H-NMR spectra of allantoic fluid samples from pHu+ and pHu− lines (n = 15) on the 17th day of incubation (**A**). OPLS-DA contribution plot indicating the contribution of discriminating variables in each line. Variables with positive contributions (blue bars) correspond to metabolites more abundant in pHu− line (e.g., glucose, kynurenine). Variables with negative contributions (orange bars) correspond to metabolites more abundant in pHu+ line (e.g., betaine, citrate). Variables with a strong contribution such as alpha-glucose in pHu− or lysine in pHu+ correspond to the most discriminating metabolites between the two lines. Metabolites were referenced by their name, followed by their chemical shift multiplied by 100 (**B**). $R^2Y = 0.70$, $Q^2 = 0.55$, CV-ANOVA = 0.0022 and X = 35.

specified by Hada et al.[20], the Krebs cycle is responsible for the complete oxidation of acetyl-CoA and the formation of intermediates required for adenosine triphosphate (ATP) production and other anabolic pathways. An overrepresentation of Krebs cycle intermediates, such as fumarate and citrate, was also observed in the allantoic fluid of the pHu+ line at E17. These results and the high concentration of alanine (the main glucogenic agent) in the pHu+ suggest a greater catabolism of amino acids in this line to produce energy, probably favored by the greater availability of BCAAs in the different extraembryonic structures (yolk, amniotic fluid and allantoic fluid). The higher abundance of 3-methyl-2-oxovalerate, 3-HObutyrate and betaine might also indicate a higher use of lipids as energy substrates in pHu+ compared to pHu− embryos. According to Zhang et al.[21], betaine is involved in lipid metabolism by playing a role in the inhibition of fatty acid synthesis and in the stimulation of fatty acid

oxidation and lipid secretion. Furthermore, 3-HObutyrate is known to act as a signal to regulate metabolism and maintain energy homeostasis during nutrient deprivation[22]. Overall, the differences observed in allantoic fluid at E17 are consistent with previous metabolomic studies performed at 6 weeks of age in serum and *Pectoralis major* muscle of pHu+ and pHu− lines, which showed that pHu+ chickens have a greater resort to lipid and amino acid catabolism, likely due to their low level of energy substrates compared to pHu−[5].

Compared to pHu+, creatine was found in higher abundance in the allantoic fluid of pHu− at E10, similar to what was observed in amniotic fluid at the same stage[8]. Creatine is deposited by the hen in the yolk and albumen[23] but is also synthesized de novo by the embryo[24]. It is a key compound that plays an important role in energy metabolism[25]. According to Muccini et al.[26], creatine can maintain ATP turnover, acid–base balance and mitochondrial function. However, creatine synthesis considerably solicits arginine and methionine metabolism[27]. Approximately 50% of all S-adenosylmethionine (SAM)-derived methyl groups are consumed by guanidinoacetate methylation, the final step in creatine synthesis[28]. At E17, the allantoic fluid of pHu− contained more glucose, suggesting a greater availability of carbohydrates in the allantoic fluid of pHu− as hatching (a very energy-consuming process) approaches. The fact that the end product of anaerobic glycolysis, lactate, is less abundant in pHu− than pHu+ at this stage may indicate that aerobic recycling of lactate is less efficient in pHu+.

Nicotinate, also known as niacin or vitamin B3, was found in greater abundance in the allantoic fluid of pHu− at E10. Nicotinate is a water-soluble vitamin that plays a central role in energy metabolism and oxidative phosphorylation. In particular, it is a precursor of the bioactive molecules nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)[29]. In humans, nicotinate stimulates muscle mitochondrial biogenesis and respiratory chain activity[30]. Due to its anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-apoptotic activities in a variety of cells and tissues, nicotinate is actively involved in the prevention of many pathological processes[31,32]. Nicotinate is mainly synthesized in the liver through the kynurenine pathway, which is the major catabolic route of tryptophan[33,34]. From E14 onwards, nicotinate was not detected in the allantoic fluid, while kynurenine accumulated, and to a greater extent, in the pHu− line compared to the pHu+ line.

Through metabolome analysis of key nutrient sources for the embryo, we previously found that formate was more abundant in the yolk and amniotic fluid of the pHu− line at E10[8]. The present study showed no difference at E10 but a higher abundance of formate in pHu+ allantoic fluid at E14 and E17 compared to pHu−. At E17, betaine was also more abundant in the allantoic fluid of pHu+. Formate and betaine are both involved in one-carbon metabolism, which includes the folate and methionine cycles, as well as the trans-sulfuration pathway (Fig. 6). One-carbon metabolism is critical for early development, as it provides one carbon (1C) units for the biosynthesis of DNA, proteins and lipids and epigenetic modification of the genome[35]. Formate has been proposed as a biomarker of impaired one-carbon metabolism[36]. For instance, high levels of formate have been observed in rats deficient in vitamin B12 or folate[37]. Therefore, it is possible that the higher abundance of formate observed at E17 in the allantoic fluid of pHu+ may reflect vitamin B12 and/or folate deficiency, two metabolites playing a crucial role in the methylation cycle[38].

Formate is produced via quite a number of processes, from different substrates, in different tissues, and in different cellular organelles. These metabolic processes occur through both folate-independent and folate-dependent reactions (Fig. 6). Regarding folate-independent reactions, formate and kynurenine can be produced from tryptophan catabolism. Interestingly, from E14 onwards, kynurenine was more abundant in the allantoic fluid of the pHu− line, while formate was more abundant in pHu+. Some formate may also be produced from histidine catabolism[39]. At E10, histidine was significantly more abundant in pHu+, while glutamate and urocanate, markers of histidine catabolism, were more abundant in the allantoic fluid of pHu− at E14 and E17. These results suggest greater histidine catabolism in the pHu− line but do not establish a direct link between histidine catabolism and formate production. However, regarding the use of formate, a significant decrease was observed between E14 and E17 in both lines. This decrease was faster in the pHu+ line than in the pHu− line with a differential of 0.072 and 0.024 arbitrary units (a.u.), respectively. This may suggest a greater utilization of this metabolite in the last third of *in ovo* development, due to greater requirements for growth and metabolism in the pHu+ line.

Several metabolites involved in purine metabolism also discriminated against the two lines. Among them, xanthosine and hypoxanthine (intermediates in guanine and adenosine metabolism, respectively) were more abundant in the allantoic fluid of the pHu− line until E14, which could explain the higher uric acid content in this line at E10 ($P = 0.02$, data not shown). In contrast, cytidine and inosine were more abundant in the pHu+ line at E17. Purine degradation seems to be more important in the pHu− line than in the pHu+ line, which is also characterized by a higher abundance of nucleosides (nucleic base + ribose). As de novo synthesis is very energy intensive, nucleosides could be reused through the purine recycling or rescue pathway, as evidenced by the higher abundance of inosine (hypoxanthine + ribose).

Betaine, presented above as a marker of fatty acid oxidation in the pHu+ line, is also considered a methyl group donor[40]. However, in our study, it is likely that betaine is considered more of an osmolyte, a molecule required for the maintenance of cellular integrity (protection against osmotic stress, dehydration, etc.)[41]. Indeed, a recent study showed that eggshell percentage, as well as eggshell thickness, were lower in pHu+, suggesting greater gas exchange and water loss in this line[42]. At E17, the higher betaine content in the allantoic fluid of pHu+ could therefore be a sign of a stronger adaptive response to ensure embryo protection. Other metabolites involved in embryo protection, such as glycine and glutamate, however, were more abundant in the pHu− line. These amino acids are involved in the production of glutathione, a major contributor to the redox balance in cells, through its ability to scavenge and reduce reactive oxygen species (ROS)[43].

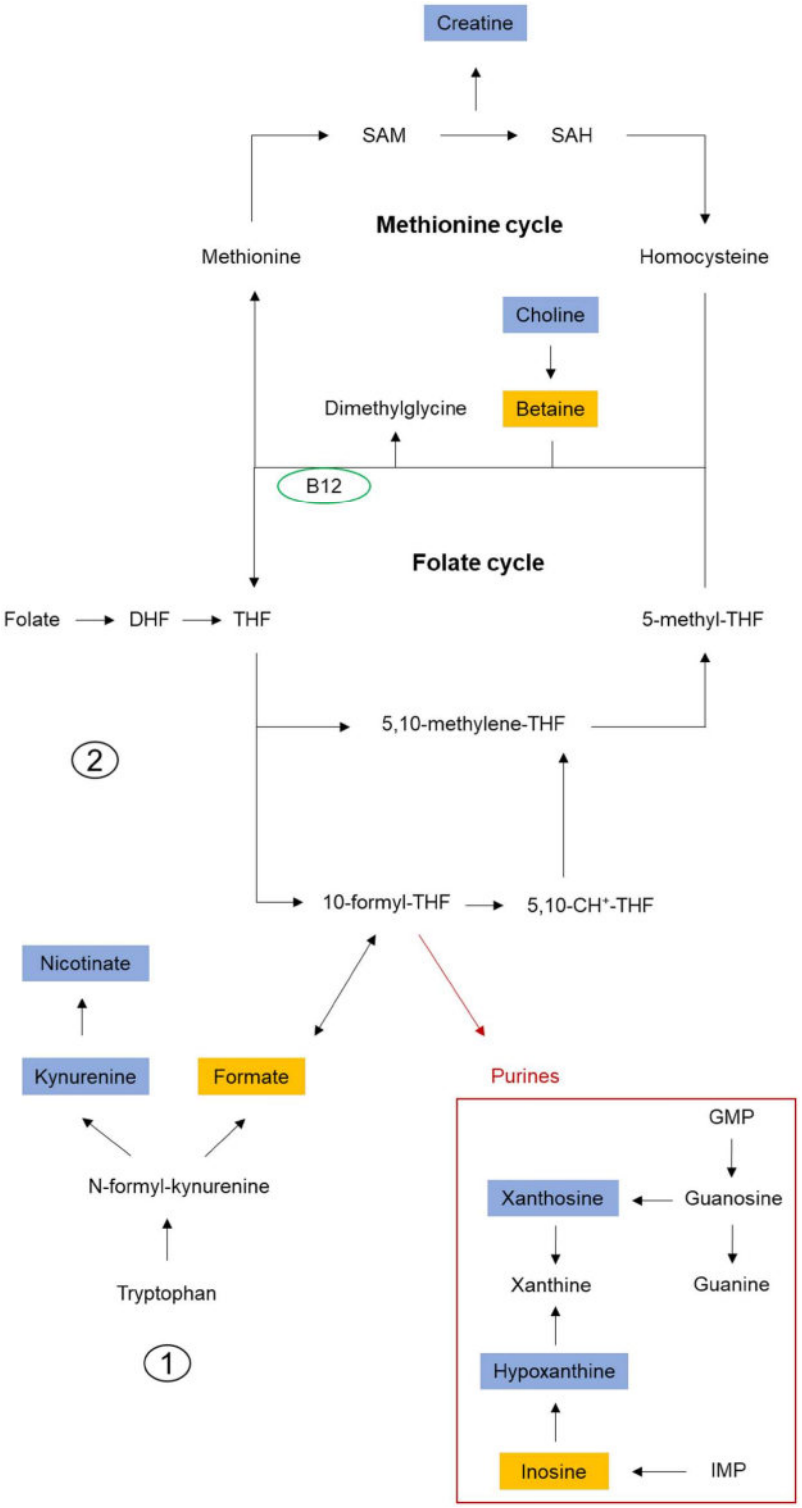


Figure 6. Representation of the folate and methionine cycles and the involvement of formate in one-carbon metabolism. In orange, the metabolites are more abundant in the allantoic fluid of pHu+, and in blue, the metabolites are more abundant in pHu−. **1** = Formate production through the folate-independent pathway and **2** = Formate production through the folate-dependent pathway. SAM: S-adenosylmethionine, SAH: S-adenosylhomocysteine, DHF: Dihydrofolate, THF: Tetrahydrofolate, 5,10-CH^+-THF: 5,10-methenyl-tetrahydrofolate, B12: Vitamin B12, IMP: Inosine monophosphate, GMP: Guanosine monophosphate. Figure adapted from Brosnan and Brosnan[39], Bozack et al.[44], and Baroukh et al.[45].

Conclusions

In conclusion, the characterization of allantoic fluid by a metabolomics approach revealed different metabolic profiles during embryogenesis, as well as between the two divergent lines for their muscle glycogen reserves. At E10, pHu+ and pHu− lines have already shown a specific metabolic signature. Due to the lower availability of energy substrates, such as glucose and creatine, pHu+ embryos may use different catabolic pathways, such as amino acid catabolism and lipid oxidation, to produce energy. Finally, our study revealed that allantoic fluid could provide early and potentially accessible biomarkers of embryo metabolism.

Methods

Sample collection. All investigators were certified by the French government to handle animal experiments. The experiments were carried out at the PEAT INRAE Poultry Experimental Facility (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12) (INRAE, Centre Val de Loire, Nouzilly, France), as described in Petit et al.[8]. The study was conducted on eggs issued from the tenth generation of the two genetic lines divergently selected for high or low breast meat ultimate pH (pHu+ and pHu−, respectively). Fertile eggs were obtained from laying hens (pHu+ and pHu−) at the peak of laying (28–29 weeks of age). Eggs were incubated under standard conditions at 37.8 °C and 56% relative humidity in the experimental hatchery of PEAT to collect the allantoic fluid on days 10 (E10), 14 (E14) and 17 (E17) of incubation. These samples were collected from the same experimental design as the yolk and amniotic fluids analyzed previously[8]. As a result, the eggs were different at each stage of sampling and egg incubation was stopped.

Preparation of ^{1}H-NMR samples. Allantoic fluids were collected from pHu+ and pHu− embryonated eggs at E10, E14 and E17 (n = 15 per line and per stage) using a syringe. The samples were centrifuged to remove cellular debris (10 min, 3000 g, 4 °C). The supernatants were ultra-filtered on Amicon columns (cut-off 3 kDa) to remove proteins and peptides of high molecular weight. The ultrafiltrates were stored at − 80 °C until NMR analysis. Ultrafiltrate samples (150 µL) were prepared by the addition of 50 µL of phosphate buffer prepared in deuterium oxide (D2O, pH = 7.4, 0.2 M) and 10 µL of trimethylsilylpropionic acid (TSP, 3.2 mM), used as an internal reference in NMR spectroscopy. Quality controls were prepared to assess analytical reproducibility by pooling 80 µL of randomly selected samples.

^{1}H-NMR processing and analysis. The ^{1}H-NMR spectra were acquired on a Bruker DRX-600 Avance III HD spectrometer (Bruker, Billerica, MA, United States) equipped with a TCI cryoprobe using a "noesypr1d" pulse sequence with a relaxation delay of 20 s, a time domain of 64 K data points, and a spectral width of 12 ppm and 64 scans. The spectra were phased, the baseline corrected and the chemical shifts referenced to the TSP. The spectra were reduced into consecutive and non-overlapping spectral regions (buckets) that were integrated and normalized by the TSP. The integration of those buckets was proportional to the concentration of the metabolites but also to the number of protons that resonate at the frequency of the peaks. Thus, each bucket represented a variable. This allowed the generation of a data matrix that was analyzed by multivariate statistics. Peak assignments were done using databases such as the Human Metabolome Database (http://www.hmdb.ca) and Chenomx NMR suite 8.1 evaluation edition (Chenomx Inc, Edmonton, Canada).

Statistical analysis. Principal component analysis (PCA) followed by orthogonal partial least squares' discriminant analysis (OPLS-DA) was performed using the SIMCA 16 software (version 16.0.2, Umetrics, Umea, Sweden) on the dataset. All data were scaled to unit variance. OPLS-DA is a supervised approach to discriminate groups, i.e., embryonic stage and line, using metabolomic data. Samples identified as being out of the confidence interval in the PCA (outliers) were removed from the analysis. For optimal model classification, variables with low regression coefficients and wide confidence intervals combined with low variable importance in projection (VIP) were iteratively removed. The overall quality of the models was appreciated by the proportion of variance in Y explained by the predictive component of the model (R^2Y) and the predictive ability of the model (Q^2). Variance analysis (CV-ANOVA) was then applied to further evaluate the significance of the results[5]. The OPLS-DA were interpreted through their score plots—a projection of the linear combinations of the metabolomics data representative of each sample on two components—and their loading plots. The loading plots represent the projection of the correlation structure of the metabolic variables (X), and the stages and lines variables (Y) on the axis pq1 et pq2 which are the combination in one vector of the loading of X weighted for the importance of the metabolites in the approximation of X (p) and the loading of Y weighted by the importance of the classes in the approximation of Y variation correlated to X (q) in the component 1 (pq1) or 2 (pq2).

In Tables 1 and 2, the main effect (stage effect) was analyzed by ANOVA while the means were compared with a Student's t test ($P \leq 0.05$).

Ethical approval and consent to participate. All animal care and experimental procedures needed for this study were conducted in accordance with current European legislation (EU Directive 2010/63/EU) and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Val de Loire (CEEA VdL). This ethics committee is registered by the National Committee under the number C2EA 19. The use of all our live animals is respectful of animal welfare and has been thought through according to the 3Rs rule (replacement, reduction, refinement). The ARRIVE guidelines were followed while reporting the experiments on animals. The points of the guide (https://arriveguidelines.org/) have been respected. All investigators were certified by the French government to handle animal experiments.

Data availibility

All data and spectra generated or analyzed during this study are included in the supplementary data file and have been deposited on https://zenodo.org; https://doi.org/10.5281/zenodo.7736015.

Received: 28 February 2023; Accepted: 22 May 2023
Published online: 31 May 2023

References

1. Givisiez, P. E. N. *et al.* Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult. Sci.* **99**, 6774–6782 (2020).
2. Moran, J.R. & Edwin, T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poult. Sci.* **86**, 1043–1049 (2007).
3. Nasir, Z. & Peebles, E. D. Symposium: avian embryo nutrition and incubation. *Poult. Sci.* **97**, 2994–2995 (2018).
4. Le Bihan-Duval, E. *et al.* Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genet.* **9**, 53 (2008).
5. Beauclercq, S. *et al.* Serum and muscle metabolomics for the prediction of ultimate pH, a key factor for chicken-meat quality. *J. Proteome Res.* **15**, 1168–1178 (2016).
6. Beauclercq, S. *et al.* A divergent selection on breast meat ultimate pH, a key factor for chicken meat quality, is associated with different circulating lipid profiles. *Front. Physiol.* **13**, 935868 (2022).
7. Métayer-Coustard, S. *et al.* Early growth and protein-energy metabolism in chicken lines divergently selected on ultimate pH. *Front. Physiol.* **12**, 643580 (2021).
8. Petit, A. *et al.* Nutrient sources differ in the fertilised eggs of two divergent broiler lines selected for meat ultimate pH. *Sci. Rep.* **12**, 5533 (2022).
9. Wu, G. *et al.* Proline metabolism in the conceptus: Implications for fetal growth and development. *Amino Acids* **35**, 691–702 (2008).
10. Da Silva, M., Labas, V., Nys, Y. & Réhault-Godbert, S. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. *Poult. Sci.* **96**, 2931–2941 (2017).
11. Zhu, Q. *et al.* Dynamic changes of metabolite profiles in maternal biofluids during gestation period in Huanjiang Mini-Pigs. *Front. Vet. Sci.* **8**, 636943 (2021).
12. ten Busch, M., Milakofsky, L., Hare, T., Nibbio, B. & Epple, A. Regulation of substances in allantoic and amniotic fluid of the chicken embryo. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **116**, 131–136 (1997).
13. Piechotta, R., Milakofsky, L., Nibbio, B., Hare, T. & Epple, A. Impact of exogenous amino acids on endogenous amino compounds in the fluid compartments of the chicken embryo. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **120**, 325–337 (1998).
14. Noble, R. C. & Cocchi, M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Prog. Lipid Res.* **29**, 107–140 (1990).
15. Gabrielli, M. G. & Accili, D. The chick chorioallantoic membrane: A model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 940741 (2010).
16. Da Silva, M. *et al.* The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid. *Mol. Cell. Proteom.* **18**, S174–S190 (2019).
17. Bourdin-Pintueles, A. *et al.* Maternal rat metabolomics: Amniotic fluid and placental metabolic profiling workflows. *J. Proteome Res.* **20**, 3853–3864 (2021).
18. Dunlap, K. A., Brown, J. D., Keith, A. B. & Satterfield, M. C. Factors controlling nutrient availability to the developing fetus in ruminants. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **6**, 16 (2015).
19. Zhu, H. *et al.* Developmental changes of free amino acids in amniotic, allantoic fluids and yolk of broiler embryo. *Br. Poult. Sci.* **63**, 857–863 (2022).
20. Hada, K. *et al.* Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in Caenorhabditis elegans. *J. Biol. Chem.* **294**, 3091–3099 (2019).
21. Zhang, L. *et al.* Betaine increases mitochondrial content and improves hepatic lipid metabolism. *Food Funct.* **10**, 216–223 (2019).
22. Rojas-Morales, P., Tapia, E. & Pedraza-Chaverri, J. β-Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response?. *Cell. Signal.* **28**, 917–923 (2016).
23. Reicher, N. *et al.* From broiler breeder hen feed to the egg and embryo: The molecular effects of guanidinoacetate supplementation on creatine transport and synthesis. *Poult. Sci.* **99**, 3574–3582 (2020).
24. Witkowska, A., Stankiewicz, M. & Poczopko, P. Changes of creatine concentration during development of chick embryo. *Acta Physiol. Pol.* **36**, 208–215 (1985).
25. Xiao, Z., Ge, C., Zhou, G., Zhang, W. & Liao, G. 1H NMR-based metabolic characterization of Chinese Wuding chicken meat. *Food Chem.* **274**, 574–582 (2019).
26. Muccini, A. M. *et al.* Creatine metabolism in female reproduction. *Pregnancy Newborn Health. Nutr.* **13**, 490 (2021).
27. Brosnan, J. T., da Silva, R. P. & Brosnan, M. E. The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids* **40**, 1325–1331 (2011).
28. Abuawad, A., Bozack, A. K., Saxena, R. & Gamble, M. V. Nutrition, one-carbon metabolism and arsenic methylation. *Toxicology* **457**, 152803 (2021).
29. Kirkland, J. B. & Meyer-Ficca, M. L. Niacin. *Adv. Food Nutr. Res.* **83**, 83–149 (2018).
30. Pirinen, E. *et al.* Niacin cures systemic NAD+ deficiency and improves muscle performance in adult-onset mitochondrial myopathy. *Cell Metab.* **31**, 1078-1090.e5 (2020).
31. Çatak, J. Determination of niacin profiles in some animal and plant based foods by high performance liquid chromatography: association with healthy nutrition. *J. Anim. Sci. Technol.* **61**, 138–146 (2019).
32. Gasperi, V., Sibilano, M., Savini, I. & Catani, M. V. Niacin in the central nervous system: An update of biological aspects and clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 974 (2019).
33. Wang, Q., Liu, D., Song, P. & Zou, M. H. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation. *Front. Biosci. (Landmark edition)* **20**, 1116–1143 (2015).
34. Linh, N. T., Guntoro, B. & Hoang Qui, N. Immunomodulatory, behavioral, and nutritional response of tryptophan application on poultry. *Vet. World.* **14**, 2244–2250 (2021).
35. Korsmo, H. W. & Jiang, X. One carbon metabolism and early development: A diet-dependent destiny. *Trends Endocrinol. Metab.* **32**, 579–593 (2021).
36. Lamarre, S. G., Morrow, G., Macmillan, L., Brosnan, M. E. & Brosnan, J. T. Formate: An essential metabolite, a biomarker, or more?. *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**, 571–578 (2013).
37. Lamarre, S. G. *et al.* Formate can differentiate between hyperhomocysteinemia due to impaired remethylation and impaired transsulfuration. American journal of physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**, E61–E67 (2012).
38. Duplessis, M., Ritz, K. E., Socha, M. T. & Girard, C. L. Cross-sectional study of the effect of diet composition on plasma folate and vitamin B12 concentrations in Holstein cows in the United States and Canada. *J. Dairy Sci.* **103**, 2883–2895 (2020).
39. Brosnan, M. E. & Brosnan, J. T. Formate: The neglected member of one-carbon metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **36**, 369–388 (2016).
40. Ueland, P. M., Holm, P. I. & Hustad, S. Betaine: A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin. Chem. Lab. Med.* **43**, 1069–1075 (2005).

41. Saeed, M. *et al.* Reconsidering betaine as a natural anti-heat stress agent in poultry industry: a review. *Trop. Anim. Health Prod.* **49**, 1329–1338 (2017).
42. Erensoy, K. *et al.* Research Note: Divergent selection for breast muscle ultimate pH affects egg quality traits in broiler breeders. *Poult. Sci.* **101**, 102142 (2022).
43. Locasale, J. W. Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer.* **13**, 572–583 (2013).
44. Bozack, A. K. *et al.* Betaine and choline status modify the effects of folic acid and creatine supplementation on arsenic methylation in a randomized controlled trial of Bangladeshi adults. *Eur. J. Nutr.* **60**, 1921–1934 (2021).
45. Baroukh, N. *et al.* Serum and soleus metabolomics signature of Klf10 knockout mice to identify potential biomarkers. *Metabolites* **12**, 556 (2022).

Acknowledgements

The authors thank the staff of the Poultry Experimental Facility (INRAE, UE 1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, 37380 Nouzilly, France) for producing and rearing animals as well as the technicians of the BOA unit (INRAE, UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture, 37380 Nouzilly, France) for measurements on birds, sampling and laboratory analyses.

Author contributions

S.R.G., E.L.D. and S.M.C. conceived and designed the experiments. S.M.C. supervised the study. A.P., L.N.D., E.C.A. and S.M.C. performed the experiments. A.P., L.N.D., S.B., S.T. and S.M.C. analyzed the data. A.P. drafted the first version of the manuscript under the supervision of S.M.C. and S.T. All of the authors read, enriched and approved the final manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the INRAE "Animal Physiology and Livestock Systems" Division [ACI_PHASE2017_INOVE].

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-023-35652-0.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M.-C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2023

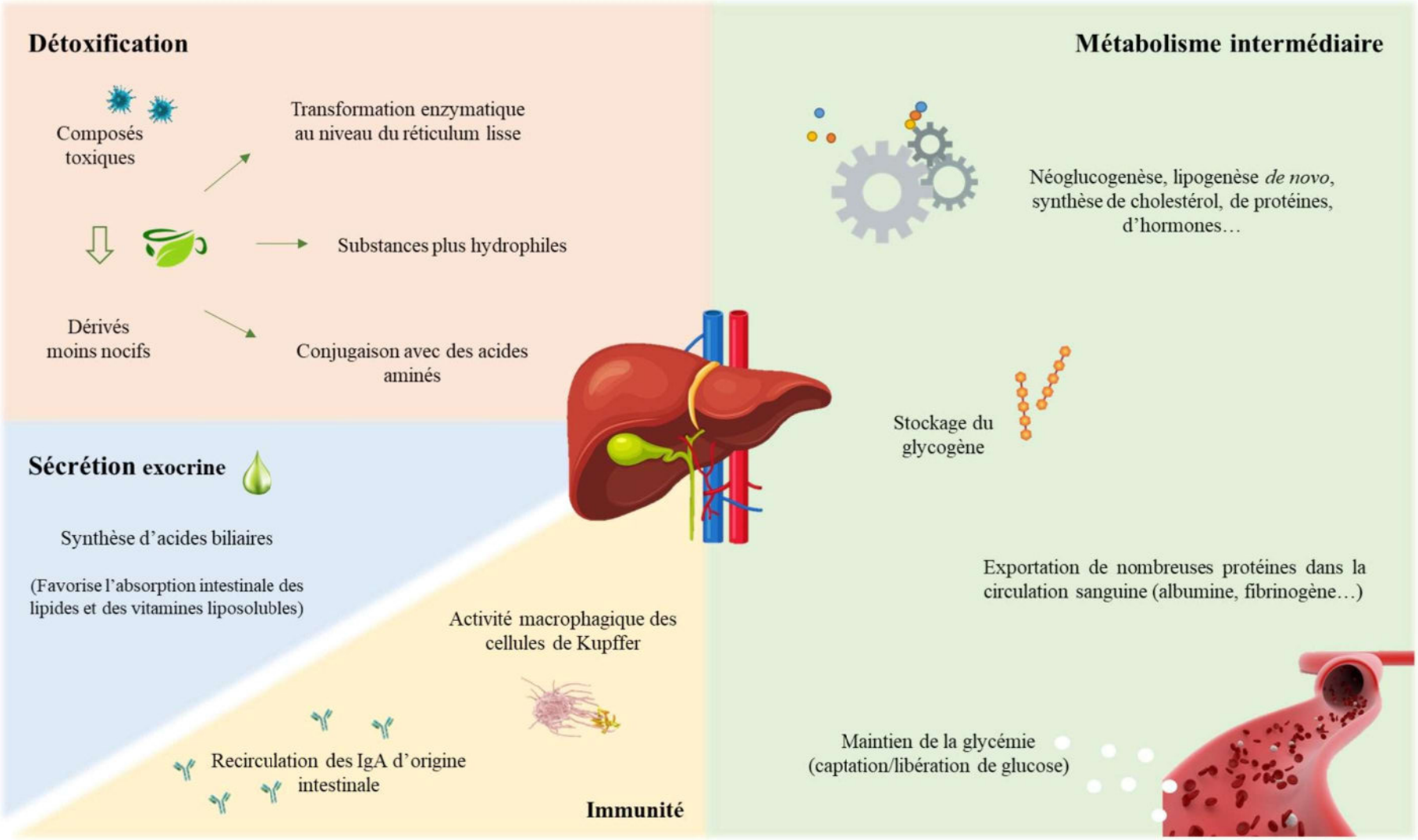


Figure 24 : Activités métaboliques du foie.

Chapitre 3 : Comment les métabolismes hépatique et musculaire évoluent-ils au cours du développement pré- et post-éclosion et quelles sont les différences entres les lignées pHu+ et pHu- ?

Contexte et objectif(s) : Le développement résulte d'un contrôle précis, dans le temps et dans l'espace, de l'expression de chaque gène (Flamant, 2001). Au cours du développement embryonnaire et post-éclosion, les nutriments peuvent moduler l'expression des gènes et induire des modifications métaboliques (Métayer-Coustard et al., 2019 ; Andrieux et al., 2022). En raison des différences de nutriments *in ovo* et des signatures métaboliques précoces observées dans le liquide allantoïque des lignées pHu+ et pHu-, les objectifs du second dispositif expérimental étaient de **I**) déterminer le moment à partir duquel l'orientation métabolique se met en place chez les lignées pHu et **II**) définir une fenêtre durant laquelle les nutriments sont les plus à même d'impacter le métabolisme des animaux et leur développement ultérieur. Pour ce faire, nous avons étudié le foie considéré comme le carrefour métabolique de l'organisme (**Fig. 24**), puis le muscle *Pectoralis major* qui est le tissu cible de la sélection.

Méthodes : Une liste de gènes en lien avec la croissance et le développement, le métabolisme glucidique, protéique et lipidique, l'activité mitochondriale, l'autophagie, le statut redox et la régulation des hormones thyroïdiennes a été établie pour explorer les principales voies et fonctions métaboliques du foie et du muscle chez les lignées pHu+ et pHu- (15ème génération de sélection). L'expression des gènes d'intérêt a été mesurée par une approche de PCR quantitative à haut débit en partenariat avec la plateforme GenomEast de Strasbourg. Le système BioMark™ HD développé par Fluidigm est un équipement de PCR en temps réel automatisé qui utilise la technologie microfluidique pour analyser simultanément des dizaines d'échantillons dans des réactions à l'échelle du nanolitre. Les cinétiques d'expression ont été élaborées à partir de prélèvements de tissus réalisés aux jours 12, 14, 18 du développement embryonnaire (E12, E14, E18), à l'éclosion (J0) et au 8ème jour de vie (J8). Afin de disposer d'une quantité suffisante de tissu pour l'ensemble des analyses, des pools de 2 à 3 animaux ont été effectués à E12, E14 et E18 (N = 8 pools par lignée). A J0 (N = 20 par lignée) et J8 (13 pHu+ et 14 pHu-), les échantillons ont été traités individuellement en tenant compte du sexe des animaux. Les profils d'expression moyens ont été obtenus grâce au regroupement

hiérarchique des gènes dont l'expression évolue dans le même sens au cours de la cinétique. Les effets « lignée » et « sexe » ont ensuite été analysés par stade.

I. Le foie

Résultats et discussion :

Chez les pHu+ et les pHu-, l'étude des cinétiques a permis d'identifier 8 clusters correspondant à 8 profils d'expression moyens. Il est important de noter que ces profils ne sont pas représentatifs d'une voie ou fonction métabolique spécifique. La période E18-J0 représente une période critique du développement avec un ralentissement du métabolisme hépatique d'une part (synthèse des protéines, autophagie, activité mitochondriale…), et une forte demande énergétique d'autre part. Cette période est également caractérisée par un véritable changement métabolique entre les deux lignées et par une grande hétérogénéité des poussins pHu+ à l'éclosion, notamment pour les paramètres pondéraux et physiologiques. En réponse à des besoins énergétiques plus élevés sur la période E12-E14, le métabolisme des pHu+ est plus actif que celui des pHu-. A l'inverse, sur la période E18-J8, la majorité des gènes différentiels étaient surexprimés chez les pHu- dont le taux de croissance est plus élevé au cours de la première semaine de vie.

Perspectives :

L'étude du métabolisme hépatique au cours du développement pré- et post-éclosion ainsi que la caractérisation des différents compartiments de l'œuf embryonné tels que le jaune, le liquide amniotique et le liquide allantoïque (Petit et al., 2022 ; Petit et al., 2023) constituent de premières pistes pour le développement de stratégies nutritionnelles précoces. Dans un contexte de programmation métabolique, la manipulation précoce de l'environnement nutritionnel représente un prochain niveau d'exploration pour moduler les réserves énergétiques du poussin, améliorer sa qualité et sa robustesse, mais aussi favoriser son développement ultérieur. Ces résultats doivent toutefois être complétés par les mesures d'expression réalisées dans le muscle *Pectoralis major*.

Ontogeny of hepatic metabolism in two broiler lines divergently selected on the ultimate pH of *Pectoralis major* muscle

Angélique Petit[1], Sophie Tesseraud[1], Anne Collin[1], Nathalie Couroussé[1], Cécile Berri[1], Elisabeth Le Bihan-Duval[1], Sonia Métayer-Coustard[1*]

[1] INRAE, Université de Tours, BOA, 37380, Nouzilly, France

Angélique Petit, angelique.petit@inrae.fr

Sophie Tesseraud, sophie.tesseraud@inrae.fr

Anne Collin, anne.collin@inrae.fr

Nathalie Courousse, nathalie.courousse@inrae.fr

Cécile Berri, cecile.berri@inrae.fr

Elisabeth Le Bihan-Duval, elisabeth.duval@inrae.fr

Sonia Métayer-Coustard, sonia.metayer-coustard@inrae.fr

***Corresponding author**: sonia.metayer-coustard@inrae.fr

Abstract

Background: During early stages of development (embryogenesis and first week of life), nutrient availability can have long-term effects on physiological functions and animal metabolism. In birds, the embryo develops in a closed structure. It depends entirely on the nutrients and energy available in the egg. The aim of this study was therefore to describe the ontogeny of pathways governing intermediate (hepatic) metabolism in pHu+ and pHu- lines divergently selected for the ultimate pH of meat (a proxy for muscle glycogen stores) and which differ in nutrient content and composition in the egg.

Results: We identified 8 clusters of genes with a common expression profile between day 12 of embryonic development and day 8 post-hatch. These clusters were not representative of a specific metabolic pathway or function. On days 12 and 14 of embryonic development (E12 and E14), the majority of genes differentially expressed between pHu+ and pHu- lines were overexpressed in pHu+. Conversely, the majority of genes differentially expressed from day 18 of embryonic development (E18) were overexpressed in pHu-. During this metabolic shift, a decrease in expression was observed for genes linked to several metabolic functions (e.g., protein synthesis, autophagy, mitochondrial activity). At hatching (D0), two distinct groups of pHu+ were observed by hierarchical clustering, that also differed in liver weight and serum parameters (e.g., triglyceride content, creatine kinase activity). At D0 and 8th day of life (D8), a sex effect was reported for several metabolic pathways. Metabolism appeared to be more active and oriented towards protein synthesis (*RPS6*) and fatty acid β-oxidation (*ACAA2*, *ACOX1*) in males than in females. In comparison, the genes overexpressed in females were related to carbohydrate metabolism (*SLC2A1, SLC2A12, FoxO1, PHKA2, PHKB, PRKAB2, GYS2*).

Conclusions:

Our study provided for the first time a detailed description of the evolution of the different hepatic metabolic pathways during the early development of embryo and post-hatch chicks. It highlighted a metabolic orientation for pHu+ line toward proteolysis, glycogen degradation, ATP synthesis, autophagy, likely in response to higher energy requirement than pHu- embryos. The metabolic orientations specific to the pHu+ and pHu- lines are established very early, probably in relation to their different genetic background and nutrients available.

Keywords: Chicken, embryo, liver, metabolism, ontogeny, gene expression

Background

The perinatal period is a critical stage during which the environment plays a major role, with potential long-term effects on animal performance, robustness, health and welfare. This is a phase of metabolic plasticity, with the possibility of metabolic reorientation and early phenotype programming, notably through nutrition (Panserat et al., 2019; Andrieux et al., 2022; Reynolds et al., 2022). In oviparous vertebrates, such as birds, embryonic development takes place entirely in the egg. Therefore, embryos are dependent on the nutrient content of the egg, including energy sources (lipids, proteins), until they hatch (Givisiez et al., 2020). Carbohydrates represent less than 1% and free glucose only 0.3% of total nutrients. As hatching approaches, reduced oxygen supply has a negative impact on energy production from fatty acid oxidation. Glycogen stores are therefore mobilized to maintain glucose homeostasis (De Oliveira et al., 2013). Given the importance of energy stores during the perinatal period (Dayan et al., 2023; Kpodo et al., 2023), we used an original model of two divergent lines for the ultimate pH of meat (pHu+ and pHu-), reflecting muscle glycogen stores (Alnahhas et al., 2014; 2015). In these lines, the main sources of nutrients differ in composition and/or nutrient content (e.g., lipids in yolk and branched-chain amino acids in amniotic fluid). Early metabolic signatures (from E10) were also observed through the study of the allantoic fluid metabolome, which indirectly reflects the embryo's metabolism (Petit et al., 2022; Petit et al., 2023).

The liver is an essential metabolic organ that performs essential exocrine and endocrine metabolic functions such as bile production, blood detoxification, regulation of circulating hormones, protein synthesis and regulation of glucose levels through glycogen storage (Ahn et al., 2019). In chickens, the liver is also the main site of *de novo* lipogenesis (Leveille et al., 1968). These functions depend on a complex hepatic vascular network that is established throughout embryogenesis, relying on both angiogenesis and vasculogenesis (Gouysse et al., 2002). Blood from the yolk circulation, digestive tract or peripheral tissues passes through the liver, where nutrients can be absorbed, stored, modified or exported to other parts of the body, and waste products from other tissues can be metabolized for excretion or recycled into useful metabolites (De Oliveira et al., 2008). According to Désert et al. (2008), the liver contributes to the adaptation of birds to changes in energy and nutrient sources, at least at the transcriptional level.

The present study aims to understand how the main pathways and functions governing hepatic metabolism are set up, during early development, in response to available nutrients and energy substrates, which evolve over time but also between pHu+ and pHu- lines (Petit et al., 2022 and 2023). The kinetics were established including days 12, 14 and 18 of embryonic development (E12, E14, E18), hatching (D0) and day 8 of life (D8). Day 12 of embryonic development corresponds to the stage at which liver weight was sufficient for sampling. The period from E12 to E18 is a dynamic period of embryonic development during which the nutrient composition of the egg is most likely to influence embryo metabolism and growth. Hatching is an energy-intensive stage, accompanied by dramatic physiological and metabolic changes. The 8th day post-hatching was chosen to assess the impact of exogenous nutrient supply during the first week of life.

Results

Evolution of embryo weight and relative liver weight

Embryo weight increased significantly throughout the kinetics, with a more pronounced effect between D0 and D8 (Fig. 1A). In comparison, relative liver weight was similar at E14 and E18, then increased at D0 and D8 (Fig. 1B). At hatching, chick weight was significantly higher in pHu+ than in pHu- ($P = 0.001$), while at D8, embryo weight was higher in pHu- ($P = 0.04$). No line effect was observed at earlier stages for embryo weight as well as over the entire kinetics for relative liver weight.

Changes in the expression of genes involved in hepatic metabolism of pHu+ and pHu- lines from E12 to D8

The expression kinetics of genes involved in growth and development, carbohydrate, lipid, protein or steroid metabolism, mitochondrial activity, autophagy, thyroid hormone regulation, antioxidant system, but also cell growth and differentiation are presented in Figure 2A (pHu-) and Figure 3A (pHu+). A modular height cut-off value in the hierarchical tree identified eight clusters of genes with distinct expression profiles during ontogeny in both pHu- and pHu+ lines. The number of genes and the expression profile of each cluster are presented in Figures 2B and 3B corresponding to the pHu- and pHu+ lines, respectively.

In the pHu- line, cluster A included the *PRKAA2*, *SLC2A12* (carbohydrate metabolism) and *CS* (mitochondrial activity) genes. The average profile showed a relatively stable expression from

E12 to E14, a decrease between E14 and E18 then an increase between E18 and D8. Cluster B including *PHKB*, *PHKG1*, *ENO3*, *SLC5A1* (carbohydrate metabolism), *SREBP1*, *PPARG*, *FASN*, *SCD* (lipid metabolism), *DIO2* (thyroid hormone regulation), *SQSTM1* (autophagy) and *IGF1* (growth and development) genes was characterized by an average profile whose expression was weak and stable from E12 to E18 then increased from hatching to reach a maximum at D8.

In contrast, cluster C regroups the *PHKD*, *PRKAG2*, *SLC2A2* (carbohydrate metabolism) and *SULT* (catecholamine and steroid metabolism) genes, whose expression decreased from E12-E14 to D8. Cluster D includes the *CAPN2*, *FBXO32*, *TRIM63* (protein metabolism), *G6PC2*, *SLC2A1* (carbohydrate metabolism), *CPT1A* (lipid metabolism), *PGC1*A (mitochondrial biogenesis), *IGFR* (growth and development), *FGF2* (cell growth and differentiation), *DIO1* and *DIO3* (thyroid hormone regulation) genes, whose expression is relatively stable from E12 to E18 before to decrease until D8. The decrease was more pronounced between D0 and D8 than between E18 and D0. Despite relatively similar profiles, cluster C was characterized by an earlier decrease in gene expression (between E14 and E18) than cluster D (between E18 and D0).

Cluster E that comprises the *EIF3F*, *RPS6*, *CTSB* (protein metabolism), *PHKA1*, *PRKAA1*, *FOXO1*, *GYS2*, *PYGL* (carbohydrate metabolism), *ACAA2* (lipid metabolism) and *CAT* (antioxidant system) genes differed from the other clusters by a succession of decreases and increases in expression. Decrease in expression was observed between E14 and E18 and between D0 and D8, while an increase occurred between E18 and D0. Cluster F includes the *AKT1*, *mTOR*, *RPTOR*, *P70S6K*, *PSMA1* (protein metabolism), *PRKAB1*, *PRKAG1*, *GSK3*, *SLC2A8* (carbohydrate metabolism), *HADH* (lipid metabolism), *COX4I1* (mitochondrial activity), *ULK1* and *ATG4B* (autophagy) genes, which had a relatively similar average profile to cluster E, except during the post-hatching period when expression levels were comparable at D0 and D8.

Cluster G that gathers the *SLC2A9* (hexose and uric acid transport), *ACOX1* (lipid metabolism), *ANT3* (mitochondrial activity), *ATG12* (autophagy), *SOD2* (antioxidant system) and *IGF2* (growth and development) genes showed a peak of expression at hatching followed by a decline at 8 days of age to reach values similar to those observed in the early stages. Finally, the expression of the *PHKA2*, *PRKAB2* (carbohydrate metabolism), *CD36* (lipid metabolism),

UVRAG (autophagy), *AR* and *IFRD1* (cell growth and differentiation) genes, belonging to cluster H, increased between E12 and D0 before decreasing.

Clusters A, B, C, D, E, F, G and H observed in pHu- (Fig. 2A) correspond approximately to clusters 1, 2, 5, 4, 3, 7, 8 and 6 in pHu+ (Fig. 3A). Most of the genes included in each cluster showed similar expression profiles between the two lines, except for those belonging to clusters A and F (Additional Table 1). Differences in expression between lines specifically concern the *PSMA1*, *GSK3*, *mTOR*, *ULK1* (cluster 1), *IFRD1* (cluster 2), *PRKAB1*, *P70S6K* (cluster 3), *G6PC2*, *AKT1* (cluster 5) and *CAT* (cluster 7) genes for which changes in kinetics or amplitude were observed.

Differentially expressed genes in the liver of pHu+ and pHu- lines

Among the 64 genes studied in the liver (Additional Table 2), normalized data were used to study differences in gene expression between pHu+ and pHu- lines, at each stage. Genes significantly ($P < 0.05$) or trendily ($P < 0.10$) differential between the two lines at E12 (n = 15) and E14 (n = 17) are shown in Table 1, those differential at E18 (n = 5), D0 (n = 10) and D8 (n = 9) in Table 2.

At E12 and E14, most differential genes were overexpressed in the pHu+ line, except for *IFRD1* and *SOD2* genes that are overexpressed in the pHu- line (Table 1). At E12, *PSMA1, AKT1, PRKAB2, PRKAG1, COX4I1, CS, ANT3, SQSTM1* and *IGF2* were significantly more expressed in pHu+ than in pHu- (trends were observed for *CAPN2, RPTOR, PHKA1, PHKB* and *PHKG1* genes). At E14, *CAPN2, RPTOR, SLC2A9, PRKAB2, PPARG, CPT1A, COX4I1, ANT3, PGC1A, SQSTM1* and *AT4B* were significantly more expressed in pHu+ than in pHu- (trends were observed for *PSMA1, PRKAG1, GSK3* and *SLC2A1* genes).

- Table 1

On the contrary, most of significant differences and trends observed between E18 and D8 indicated overexpression in pHu- line (Table 2). Indeed, higher expression levels were observed for *FoxO1*, *ACOX1*, *SOD2* and *IFRD1* at E18; *PRKAG2*, *SLC2A8*, *CPT1A*, *CD36*, *UVRAG* and *IFRD1* at D0 (trends for *PRKAB2, HADH* and *SOD2*); *SLC2A9*, *PHKB*, *PRKAA1*, *PRKAG2*, *FoxO1* and *DIO3* at D8 (trend for *PHKD*). Only the *G6PC2* (E18), *SREBP1* (D0), *SLC2A2* and *CAT* (D8) genes were overexpressed in the pHu+ line.

- Table 2

Differentially expressed genes in the liver of males and females

Interestingly, we observed differential expression of several genes between male and female chicks. At hatching, the *RPS6, PRKAA1, SLC2A8*, *PPARG, ACAA2, ATG12* and *DIO1* genes were overexpressed in males (trends for *COX4I1* and *IGF2*), while only *PGC1A* was overexpressed in females (trends were observed for *SLC2A1* and *FoxO1*) (Table 3).

- Table 3

At 8 days of age, the *RPS6, PRKAA1, ACAA2, ATG12* and *DIO1* genes were overexpressed in males (trends for *SLC5A1* and *ACOX1*), while the *PHKA2, PHKB* and *SLC2A12* genes were overexpressed in females (trend for *PRKAB2* and *GYS2*) (Table 4). No line*sex interaction was reported (data not shown), except for the *SLC2A9* gene at D8 for which expression was significantly lower in pHu+ males than in pHu- males and females of both lines.

- Table 4

Phenotypic characterization of pHu- and pHu+ at hatching

Based on the level of expression of genes belonging to clusters 1, 5, 6 and 7 at hatching, we were able to identify two subgroups of chicks (G1 and G2) in the pHu+ line but not in the pHu- line (Fig. 3A). When looking at their phenotypical differences, we observed that one of the groups (named G1) exhibited higher liver weight, triglyceride concentration and creatine kinase activity in their serum than the other group (named G2) (Table 5). Whatever the pHu+ subgroup considered, pHu- chick exhibited at hatching lower body weight and serum creatine kinase activity. The pHu- chicks differs from those of the G1 group of pHu+ by a lower liver weight and from those of the G2 group by a higher serum hydroxybutyrate concentration. No significant difference was observed between pHu- and pHu+ from the two groups for residual yolk sac weight and yield, serum glucose, uric acid, total antioxidant status and liver glycogen measured through the glycolytic potential. For all parameters studied, no sex effect or group*sex interaction was observed (data not shown).

- Table 5

At D8, pHu- chicks (both males and females) were significantly heavier and exhibited higher serum hydroxybutyrate concentrations than pHu+ chicks (Table 6). At this age, pHu- chicks also tend to have a higher liver glycolytic potential than pHu+ chicks. A sex effect was reported

for glucose concentration and relative liver weight. Glucose concentration was higher in males while relative liver weight was higher in females. No line*sex interaction was observed.

- Table 6

Discussion

In fast-growing broilers, metabolic orientation seems to be established very early during embryonic development. Indeed, specific metabolic signatures were observed by Petit et al. (2023), on day 10 of embryonic development in the allantoic fluid of the two experimental lines (pHu+ and pHu-), divergently selected for ultimate pH of meat, an indicator of muscle glycogen stores (Alnahhas et al. 2014; 2015). Allantoic fluid is a compartment that in addition to storing nitrogenous waste products and other metabolites can reflect the metabolic activity of the embryo. To understand the mechanisms involved in the early metabolic orientation of pHu lines, we studied the expression kinetics of a wide range of genes involved in several liver pathways and functions during the pre- and post-hatching period (E12 to D8). Although the transition between the embryonic and post-hatching periods is well documented in chickens, studies have mainly focused on lipid and carbohydrate metabolism, often overlooking the hatching process (De Oliveira et al., 2013; Cogburn et al., 2018; Hicks et al., 2019; Xu et al., 2019; Massimino et al., 2020; Surugihalli et al., 2022). Firstly, we described in detail the expression kinetics of the genes involved in growth and development, protein, carbohydrate and lipid metabolism, mitochondrial activity, autophagy, antioxidant protection and thyroid hormone regulation. Secondly, we explored the differences that may contribute to the metabolic characteristics of the pHu+ and pHu- lines.

Although there are differences in kinetics or amplitude for the expression of some genes, the expression profiles are similar between the two lines, suggesting that selection on the ultimate pH of meat had no major effect on the establishment of metabolic pathways in the liver. Furthermore, our study clearly showed that the different profiles identified are not representative of specific metabolic pathway or function, each of the cluster gathering genes related to many functions.

Stages E12 and E14 are characterized by very high expression levels for genes involved in protein metabolism (e.g., *AKT1, PSMA1, CTSB*…), carbohydrate metabolism (e.g., *FoxO1*, *PHKD, PRKAA1, G6PC2, SLC2A1, SLC2A2*…), fatty acid β-oxidation (e.g., *ACAA2, HADH*), mitochondrial activity (e.g., *CS*), autophagy (*ULK1*, *ATG4B*) and hormone metabolism (*SULT*).

These results suggest a very active hepatic metabolism to meet the embryo's energy requirements during a period of development when growth and metabolic rates are highest, and energy required for growth mainly comes from β-oxidation of fatty acids derived from yolk lipids (Nangsuay et al., 2015 a and b; Cogburn et al., 2018; Khaliduzzaman et al., 2020).

Between E12-E14 and E18, the majority of genes involved in protein synthesis (*EIF3F, AKT1, mTOR, RPTOR, P70S6K, RPS6*), carbohydrate metabolism (PRKAA2, *PRKAG1, PYGL, GSK3, GYS2, SLC2A8, SLC2A12*), β-oxidation of medium- and short-chain fatty acids (*HADH*), mitochondrial activity (*CS*) and autophagy (*ULK1, ATG4B, ATG12*) showed a fall in expression suggesting a slowdown in hepatic metabolism at E18, which could be partly due to a reduction in available energy and the use of nutrients such as fatty acids (Hu et al., 2017; Givisiez et al., 2020).

The embryonic to neonatal transition is characterized by major changes in liver gene expression. One of the most striking features concerns lipid metabolism with the increased expression of lipogenesis-related genes (*FASN, SREBP1*, *SCD*, *PPARG*) and decreased expression of lipolysis-related genes (*CPT1A, PGC1A*) as previously observed in chickens (Cogburn et al., 2018; Surugihalli et al., 2019 and 2022) and ducks (Massimino et al., 2020). While embryos use yolk lipids as the main energy substrate after the first week of incubation, hatched chick must switch to a diet rich in carbohydrates. Therefore, the post-hatching dietary transition is accompanied by major metabolic changes in the liver, which acquired the ability to synthesize its own lipids through *de novo* lipogenesis from carbohydrates (Hicks et al., 2017; Massimino et al., 2020).

Our results also show drastic changes in the expression of deiodinases during the embryonic to neonatal transition, with especially a strong increase for *DIO2* and decrease for *DIO3* in agreement with previous results (Cogburn et al., 2018). Deiodinases are key regulators of the intracellular thyroid hormone contents (Mullur et al., 2014). Triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) are related to heat production, as well as glycogen and fat mobilization. Thyroid hormones are also involved in the development of the pipping muscle and preparation for eggshell rupture (Christensen et al., 2003). Lu et al. (2007) and Reyns et al. (2003) reported that liver and plasma T3 levels were relatively low throughout the incubation period, with a significant increase at hatching that persisted through the first week of life. Conversely, T4 levels increased significantly from E15 and reached a peak at E19. Between E12 and E18, our study showed a very high expression of hepatic *DIO3*, which converts T4 and T3 into inactive

metabolites i.e., rT3 and diiodothyronine (T2) respectively, suggesting that DIO3 prevents premature exposure of developing embryonic tissues to high levels of thyroid hormones during this period (Too et al. (2017). Between E18 and D8, we observed a constant decrease in *DIO3*, a transient increase in *DIO1* at hatching and a significant increase in *DIO2* in order to supply T3 (metabolically active thyroid hormone) to the chicks at hatching.

Hatching is also a key period during which a relay is established between insulin-like growth factors (IGFs) that play an important role in development and metabolism via autocrine/paracrine mechanisms. In the current study, *IGF2* gene was expressed in the liver as early as E12, with a peak at hatching. IGF2 is more strongly associated with embryogenesis than IGF1 and remains at a high level in organs throughout the growth of the embryo (Liu et al., 2016). Conversely, *IGF1* expression was very low during embryogenesis and increased considerably from D0 to D8. Our results are consistent with previous studies that reported a strong increase in *IGF1* expression in the liver after hatching, this organ being the main contributor of circulating IGF1 (Burnside and Cogburn, 1992; McMurtry et al., 1997).

Our study highlighted several genes showing a transient increase in expression at hatching. These are involved in glycogen metabolism (*GYS2*, *PYGL*, *PHKA1*, *PRKAB1*, *PRKAB2*, *PRKAG1*) and mTOR signaling (*RPTOR*, *p70S6K*), some of them being also associated with the cellular response to nutrient levels (*PRKAB*1, *PRKAB2*, *PRKAG1*, *RPTOR*) (Additional Figure 1). We also found genes related to autophagy (*UVRAG*, *ATG12*, *ATG4B*), a lysosomal degradation pathway known to be an essential process of cellular metabolism and a major contributor to homeostasis through the mobilization of various cellular energy stores (Singh & Cuervo, 2011; Tesseraud et al., 2021) and to mitochondrial function (*COX4I1*, *ANT3*) acting on oxidative phosphorylation and ATP production. All these observations are consistent with the high energy demand associated with the hatching process. Our study also showed a transient increase in expression for redox status-related genes (*CAT*, *SOD2*, *ACOX1*) at hatching, in response to the production of reactive oxygen species and increased oxygen availability during this specific period. Moreover, the increased expression of genes related to purine metabolism (*SLC2A9*) and mRNA-to-protein translation (*p70S6K*, *EIF3F*) between E18 and D0 could indicate overactivation of purine metabolism and protein synthesis, as previously suggested by Peng et al. (2018).

The study of differentially expressed genes in the liver also revealed early metabolic differences (as early as E12) between the pHu+ and pHu- lines. At E12 and E14, it should be noted that

most differential genes were overexpressed in pHu+, while from E18 onwards, differential genes were overexpressed in pHu-. Among differentially expressed genes at E12 and E14, the majority are involved in protein metabolism, carbohydrate metabolism and in processes linked to mitochondrial activity such as Krebs cycle, respiratory chain, ADP and ATP transport. In the pHu+ line, glucose generated by glycogenolysis could have stimulated the Krebs cycle for ATP production *via* overexpression of mitochondrial genes (*CS*, *COX4I1*, *ANT3*). At E14, we observed a peak of expression and overexpression of the *PGC1A* gene in pHu+. *PGC1A* encodes a transcriptional coactivator regulating genes involved in energy metabolism (mitochondrial biogenesis, gluconeogenesis and fatty acid oxidation). This suggests greater energy requirements and more intense metabolism in the pHu+ line during the period of strong embryonic growth. The significant number of differential genes between lines during the early stages of embryonic development indicates that metabolic orientation differs between the two lines as early as E12, with a major switch at E18, when the availability of nutrients and energy becomes lower.

At D0, 70% of the genes differentially expressed between the pHu+ and pHu- lines were related to lipid or carbohydrate metabolism, while at D8, 67% of the genes were only related to carbohydrate metabolism. At E18 and D0, the overexpression of genes linked to lipid metabolism and more specifically to fatty acid β-oxidation and transport (*ACOX1*, *CPT1A*, *HADH*, *CD36*) in pHu- could indicate a greater use of lipids in this line during the perinatal period. These data are in agreement with the residual yolk sac weight, which tends to be higher in the pHu+ line, and suggest better yolk sac resorption in the pHu- line. At D8, the differences observed for genes involved in carbohydrate metabolism could be related to differences in muscle glycogen levels observed from hatching between the two lines (Métayer-Coustard et al. 2021) or to growth, pHu- chicks being heavier at this age than pHu+. Recent observations (not published) revealed that pHu- chicks are more active during the days after hatching than pHu+ chicks, which is consistent with the greater hepatic expression of genes in carbohydrate metabolism in this line, probably in response to the increased muscle energy need (Wasserman and Cherrington, 1991).

As well as being involved in carbohydrate and lipid metabolism, FoxO1 regulates metabolic homeostasis in response to oxidative stress. Alterations in oxidative stress mediated by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) cause a significant increase in *FOXO1* transcriptional activity with a major impact on the expression of superoxide dismutase (*SOD*),

a key antioxidant enzyme (Xing et al., 2018). The antioxidant protection of the chicken embryo during incubation and early postnatal development plays an important role in chick viability (Yang et al., 2021). The significantly higher expression of *FOXO1* at E18 and of *SOD2* (mitochondrial form) at E14 and E18 (trend at D0) could indicate a better removal of ROS and consequently, a better protection of mitochondria against cell death in the liver of pHu- embryos. Uric acid is the main nitrogenous waste product in birds but it is also known to be a potent antioxidant (Tsahar et al., 2006). Glucose transporter 9 (GLUT9) is a key transporter that mediates the uptake of uric acid in hepatocytes (So et al., 2010; Zeng et al., 2022). In the liver, expression of the *SLC2A9* gene is positively correlated with serum uric acid level (Ding et al., 2021).

Hierarchical clustering based on gene expression revealed two subgroups of pHu+ chicks, that we named G1 and G2. They mainly differ for the expression profiles of genes involved in energy metabolism, especially in sugar transport (*SLC2A2*, *SLC2A8*, *SLC2A12*), glycogen metabolism (*GSK3*, *PHKA2*), autophagy (*AKT1*, *mTOR*, *RPTOR*, *ULK1*, *ATG4B*, *UVRAG*), mitochondrial activity (*CS*, *COX4I1*) and AMPK-mediated regulation of energy metabolism (*PRKAA2*, *PRKAB2*, *PRKAG1*, *PRKAG2*) (Additional Figure 2). The G1 group was characterized by higher liver weight and blood triglyceride content and, to a lower extent, by a higher content of non-esterified fatty acids and hydroxybutyrate than G2. High concentrations in triglycerides support a difference in the availability or use of lipid substrates between G1 and G2 groups, despite they exhibited a similar residual yolk sac weight. As suggested by Ohtsu et al. (2003), residual yolk sac lipids are converted to ketone bodies, an essential energy source in newly hatched chicks. Ketone bodies are produced primarily in the liver as a result of the incomplete oxidation of long chain fatty acids. They readily serve as fuel for extra-hepatic tissues including brain, skeletal muscles, intestines and kidneys.

At hatching, blood creatine kinase activity was much higher in pHu+ than in pHu-, with levels 4 to 8 times higher in groups G2 and G1, respectively. Creatine kinase is a cytoplasm or mitochondria protein abundantly expressed in tissues with a high and fluctuating energy demand such as muscle. It catalyzes the conversion of creatine to phosphocreatine, involving the conversion of adenosine triphosphate (ATP) to adenosine diphosphate (ADP) (Pan et al., 2023). High CK activity in G1 chicks could be a sign of more intense muscle activity, particularly for the pipping muscle used to break eggshell during hatching, or of higher phosphocreatine supply due to low glycogen stores (Pulikanti et al., 2010; Dayan et al., 2023).

Elevated CK activity may also reflect muscle damage (Koch et al., 2014), suggesting that muscles of pHu+ chicks would be metabolically more affected at hatching than those of pHu- chicks, probably due to their low muscle energy reserves (Métayer-Coustard et al., 2021).

Our study also revealed some differences in gene expression between males and females, despite a similar early growth rate. In contrast to the mammalian sex determining system, an embryo with two Z chromosomes (ZZ) becomes a male, while an embryo with both Z and W chromosomes (ZW) becomes female in avian species (Kuroiwa, 2017). As expected, all genes located on the Z chromosome, such as *RPS6*, *ACAA2*, *ATG12* and *PRKAA1*, were significantly more expressed in males than in females at D0 and D8. This confirms results of Wang et al. (2020) on the catalytic α_1 subunit of AMPK (*PRKAA1*) in the liver. Other autosomal-localized genes were differentially expressed between males and females from hatching. Interestingly, genes involved in protein synthesis and fatty acid β-oxidation were overexpressed in males while genes involved in glycogen metabolism and glucose transport were overexpressed in females. The difference observed in relative liver weight, in favor of females, could be linked to a different chemical composition.

Conclusions

This study provided a detailed description of the evolution of pathways and functions governing hepatic metabolism during embryonic and post-hatching development. It also highlighted the early establishment of metabolic orientation in the pHu+ and pHu- lines, probably in relation to their genetic background and the availability of nutrients in the egg. Indeed, during early *in ovo* development (E12 and E14), pHu+ embryos are characterized by higher expression levels for genes involved in proteolysis, glycogen degradation, ATP synthesis and autophagy, probably in response to higher energy requirements than pHu- embryos. The number of genes overexpressed in pHu- at the end of incubation (E18 to hatching) suggests that they have a better capacity than pHu+ to mobilize different metabolic pathways to overcome the increasing energy demand as hatching approaches and the slowdown in hepatic metabolism. Chicks of the pHu+ line are also characterized by greater heterogeneity at hatching, a lower growth rate during the first week of life and much higher blood CK activity than in pHu-, which could be a sign of greater muscle damage, probably in response to their muscle glycogen deficit.

Methods

Animals and sample collection

All animal care and experimental procedures needed for this study were conducted in accordance with current European legislation (EU Directive 2010/63/EU) and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Val de Loire. This ethics committee is registered by the National Committee under the number C2EA 19. Up to 8 days of age, chicks of the pHu lines were raised under conventional conditions at the PEAT INRAE Poultry Experimental Facility (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12). The study was conducted on embryonated eggs from two genetic lines divergently selected for high or low ultimate breast meat pH (pHu+ and pHu-, respectively). Fertile eggs were collected for 10 days at the peak of laying (29 weeks of age). Eggs were stored at 16°C and then incubated under standard conditions at 37.8°C and 55% relative humidity in the PEAT experimental hatchery. The various egg fluids (yolk, amniotic fluid and allantoic fluid) and tissues (liver, *Pectoralis major* muscle, pipping muscle, duodenum and jejunum) were collected on days 10 (E10), 14 (E14) and 18 (E18) of incubation. The eggs selected for sampling were chosen based on average weight (± 5%) and day of laying. Before and during the incubation period, egg weight was significantly higher in the pHu+ line than in the pHu- line (data not shown). On the 18th of incubation, the remaining eggs were placed in a hatcher (37.7°C and 65% relative humidity) to take tissue and blood (occipital sinus) samples, at hatching (D0) and at 8 days of life (D8). Candling was performed on day 7 (E7) and 14 of incubation to assess early and late embryonic mortality in both lines. During the first week of life, the reared chicks were fed *ad libitum* with a starter feed. In order to obtain a sufficient amount of tissue for all the analyses, pools of 3 animals were made for the E12 and E14 stages against 2 animals for the E18 stage. For stages D0 and D8, tissue samples were collected and analyzed individually, considering the sex of the animals. Of the three nutritional statuses tested at D8 (fasted, fed and re-fed for 1 hour), only fed chicks were selected. The objective was to consider embryos and chicks with a constant supply of nutrients throughout the kinetics (nutrients available *in ovo*, use of the residual yolk sac at hatching and chick feeding). Before freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C, all samples were weighed, except at E12, a stage for which it was difficult to collect the entire liver and *Pectoralis major* muscle.

RNA extraction

Messenger ribonucleic acids (mRNA) were extracted from 30 mg of tissue (liver) using the NucleoSpin® RNA mini-Kit (MACHEREY-NAGEL, Hoerdt Cedex, France) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA concentration was measured with a spectrophotometer (NanoDrop ND 1000) and RNA integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis (1%) with the presence of the two major ribosomal RNA bands (28S and 18S).

RT-qPCR using microfluidic technology (BioMark™ HD)

The mRNAs of 64 genes involved in protein, carbohydrate, lipid and steroid metabolism, but also in mitochondrial activity, autophagy, thyroid hormone regulation, antioxidant system, growth and development were quantified. All primers, listed in Additional Table 2, were tested prior to experimentation. Some were extracted from the literature and others were designed from the chicken genome (Gallus gallus). The choice of primers in the regions of interest was made using Primer-BLAST and Primer3Plus. Validation of their efficiency ranging from 1.80 to 2.20 was performed using cascade dilution of a pool of cDNA, and their specificity was confirmed by sequencing the PCR products (GENEWIZ, Part of Azenta Life Sciences, Leipzig, Germany). The quality of total RNA was evaluated by capillary electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent) and conducted on a sampling (12 total RNAs randomly selected by tissue). Total RNAs from 7 samples were quantified by fluorimetry (Qubit or Varioskan, Thermofisher). A volume of 1 µL of total RNA (100 ng/µL) was reverse-transcribed to cDNA with 4 µL of Fluidigm Reverse Transcription Master Mix (100-6297, Fluidigm). The reverse transcription was carried out according to the following program: 25°C/5 min, 42°C/30 min and 85°C/5 min. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009). PCR reactions were conducted in integrated fluidic circuits (IFCs), the Dynamic™ Arrays (96.96 IFC). Due to the low final volume of the PCR reactions (6 to 9 nL), a pre-amplification of the target genes was performed (PreAmp Master Mix, 100-5744, Fluidigm). It consists of a multiplex PCR with a reduced number of cycles (10 to 20 cycles) using a pool of all primer or probe pairs that will be used later on the BioMark™ HD. The pre-amplification was carried out according to the following program: 95°C/2 min, 14 cycles at 95°C/15 s and 60°C/4 min. Unused primer residues were digested with exonuclease I (20000 U/mL, M0293L, New England BioLabs) at 37°C for 30 min then at 80°C for 15 min. Each final product was diluted 1:5 by adding reduced TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0 + 0.1 mM EDTA, 12090-015, Invitrogen). For the preparation of the primer plate, a mix containing 371 µL of 2X

Assay Loading Reagent (85000736, Fluidigm) and 296.8 µL of reduced TE buffer was prepared. A volume of 6.3 µL of this mix and 0.7 µL of primers (forward and reverse, 50 µM) was deposited in each well of the assay plate. Negative controls, without primers, received 0.7 µL of reduced TE buffer and 6.3 µL of Dilution Mix. For each sample plate, a mix containing 371 µL of 2X SsoFast Evagreen Supermix with Low ROX (172-5211, Bio-Rad Laboratories) and 37.1 µL of 20X DNA Binding Dye sample reagent (100-3738, Fluidigm) was prepared. A volume of 3.85 µL of this mix and 3.15 µL of pre-amplified cDNA was deposited in each well of the assay plate. Negative controls, without cDNA, received 3.85 µL of mix and 3.15 µL of reduced TE buffer. After vortexing and centrifugation, priming of the Dynamic™ array and loading with pre-amplified amplicons and primer pairs (5 µL per well) was performed using an appropriate IFC controller (IFC Controller HX, 96.96 Dynamic Array IFCs). For detailed instructions for injecting control line fluid, see the Control Line Fluid Loading Procedure Quick Reference (68000132). PCR was performed using the GE Fast 96x96 PCR+Melt v2 thermal cycler protocol (thermal mix: 70°C/2400 s, 60°C/30 s; Hot Start: 95°C/60 s; PCR of 30 cycles: 96°C/5 s, 60°C/20 s, 60°C/3 s). The software required for this protocol are: Real-Time PCR Analysis software v.3.0.2 or later and BioMark HD Data Collection software v.3.1.2 or later.

Data preprocessing and gene expression analysis

The first part of the analysis was to visualize the cycle threshold (Ct) values as well as the melting curves with the Fluidigm real-time PCR analysis software. Genes with very high ($Ct < 2.5$) or very low ($Ct > 24$) expression were removed from the analyses, just as genes for which an aberrant melting temperature (Tm) or multiple amplicons (dimers of primers or non-specific products) were observed in the melting curves. First, the expression data were normalized using interplate calibrators. The delta of Ct (ΔCt) was then calculated according to the following formula:

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

Relative gene expression = $2^{\Delta Ct\ target}$ / normalization factor

Housekeeping genes were selected and the normalization factor calculated using geNorm software (3.5).

Housekeeping genes used to normalize expression of target genes (line and sex effects for each stage) were *DIO1* and *HADH* at E12; *GAPDH* and *SLC2A2* at E14; *PRKAG1* and *YWHAZ* at E18; *RPTOR* and *ATG4B* at D0; *ANT3* and *COX4I1* at D8. As embryogenesis and early life are dynamic periods of development, housekeeping gene expression fluctuated between the

different stages, which explains why expression data were not normalized. However, interplate normalization using calibrators was a relevant argument to free ourselves from target gene normalization.

Biochemical assays

Serum concentrations of glucose (Glucose GOD-POD, ref 981780, Thermo Fisher Scientific), uric acid (Uric Acid AOX, ref 981788, Thermo Fisher Scientific), triglycerides (ref 981786, Thermo Fisher Scientific), non-esterified fatty acids (NEFA-HR(2), FUJIFILM), hydroxybutyrate (RANBUT, RB 1007/MD, RANDOX) as well as total antioxidant status of serum (TAS, NX2332, RANDOX), creatine kinase activity (CK-NAC, ref 92307, BIOLABO) and liver glycolytic potential (Glucose HK, ref 981779 and L-lactic acid, ref 984308, Thermo Fisher Scientific) were measured spectrophotometrically using commercial kits.

Statistical analysis

For each pHu line, heatmaps were produced in two steps. The first step was to perform hierarchical clustering on all genes and samples, in order to check the classification of stages (E12, E14, E18, D0 and D8) and identify any outliers. This approach also revealed two groups (G1 and G2) at D0 in the pHu+ line. In the second step, developmental stages were ordered and hierarchical clustering was performed on genes only. At D0 and D8, samples were ordered according to chick sex. Groups 1 and 2 obtained at D0 in the pHu+ line were kept as obtained in the first step. In each group, males and females were pooled together. For graphical representations, the variables were transformed into log2, centered and reduced. Heatmaps were obtained from R software (4.2.2) using correlation as a distance measure (Pearson) and ward.D2 method as aggregation criterion for clusters. The pheatmap (1.0.12), grDevices (4.1.2) and Stats (4.1.2, hclust function) packages were also used. Average expression profiles were generated using the cutree function.

For relative expression data, serum assays and weight parameters, main effects and interactions were analyzed by one- or two-way ANOVA ($P \leq 0.05$). Depending on the number of samples, means were compared by Student's t-test or Tukey's test (XLSTAT 2020.5.1 and StatView 5).

List of abbreviations

ADP: Adenosine diphosphate

AMP: Adenosine monophosphate

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATP: Adenosine triphosphate

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid

CK: Creatine kinase

Ct: Cycle threshold

G1: Group 1 (pHu+)

G2: Group 2 (pHu+)

GLUT9: Glucose Transporter 9

IFCs: Integrated fluidic circuits

IGFs: Insulin-like growth factors

mRNA: Messenger ribonucleic acids

PCR: Polymerase Chain Reaction

ROS: Reactive oxygen species

T2: Diiodothyronine

T3: Triiodothyronine

T4: Thyroxine

Tm: Melting temperature

References

1. Panserat S, Marandel L, Seiliez I, Skiba-Cassy S. New Insights on Intermediary Metabolism for a Better Understanding of Nutrition in Teleosts. Annu Rev Anim Biosci. 2019;7:195-220.
2. Andrieux C, Petit A, Collin A, Houssier M, Métayer-Coustard S, Panserat S, Pitel F, Coustham V. Early phenotype programming in birds by temperature and nutrition: A mini-review. Frontiers in Animal Science. 2022;2.
3. Reynolds LP, Diniz WJS, Crouse MS, Caton JS, Dahlen CR, Borowicz PP, Ward AK. Maternal nutrition and developmental programming of offspring. Reprod Fertil Dev. 2022;35(2):19-26.
4. Givisiez PEN, Moreira Filho ALB, Santos MRB, Oliveira HB, Ferket PR, Oliveira CJB, Malheiros RD. Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. Poult Sci. 2020;99(12):6774-6782.
5. De Oliveira JE, Druyan S, Uni Z, Ashwell CM, Ferket PR. Metabolic profiling of late-term turkey embryos by microarrays. Poult Sci. 2013;92(4):1011-28.
6. Dayan J, Melkman-Zehavi T, Reicher N, Braun U, Inhuber V, Mabjeesh SJ, Halevy O, Uni Z. Supply and demand of creatine and glycogen in broiler chicken embryos. Front Physiol. 2023;14:1079638.
7. Kpodo KR, Proszkowiec-Weglarz M. Physiological effects of in ovo delivery of bioactive substances in broiler chickens. Front Vet Sci. 2023;10:1124007.
8. Alnahhas N, Berri C, Boulay M, Baéza E, Jégo Y, Baumard Y, Chabault M, Le Bihan-Duval E. Selecting broiler chickens for ultimate pH of breast muscle: analysis of divergent selection experiment and phenotypic consequences on meat quality, growth, and body composition traits. J Anim Sci. 2014;92(9):3816-24.
9. Alnahhas N, Le Bihan-Duval E, Baéza E, Chabault M, Chartrin P, Bordeau T, Cailleau-Audouin E, Meteau K, Berri C. Impact of divergent selection for ultimate pH of pectoralis major muscle on biochemical, histological, and sensorial attributes of broiler meat. J Anim Sci. 2015;93(9):4524-31.
10. Petit A, Réhault-Godbert S, Nadal-Desbarats L, Cailleau-Audouin E, Chartrin P, Raynaud E, Jimenez J, Tesseraud S, Berri C, Le Bihan-Duval E, Métayer-Coustard S. Nutrient sources differ in the fertilised eggs of two divergent broiler lines selected for meat ultimate pH. Sci Rep. 2022;12(1):5533.

11. Petit A, Tesseraud S, Beauclercq S, Nadal-Desbarats L, Cailleau-Audouin E, Réhault-Godbert S, Berri C, Le Bihan-Duval E, Métayer-Coustard S. Allantoic fluid metabolome reveals specific metabolic signatures in chicken lines different for their muscle glycogen content. Sci Rep. 2023;13(1):8867.

12. Ahn J, Woodfint RM, Lee J, Wu H, Ma J, Suh Y, Hwang S, Cressman M, Lee K. Comparative identification, nutritional, and physiological regulation of chicken liver-enriched genes. Poult Sci. 2019;98(7):3007-3013.

13. Leveille GA, O'Hea EK, Chakbabarty K. In vivo lipogenesis in the domestic chicken. Proc Soc Exp Biol Med. 1968;128(2):398-401.

14. Gouysse G, Couvelard A, Frachon S, Bouvier R, Nejjari M, Dauge MC, Feldmann G, Hénin D, Scoazec JY. Relationship between vascular development and vascular differentiation during liver organogenesis in humans. J Hepatol. 2002;37(6):730-40.

15. De Oliveira JE, Uni Z, Ferket PR. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. World's Poult Sci J. 2008;64(4):488-499.

16. Désert C, Duclos MJ, Blavy P, Lecerf F, Moreews F, Klopp C, Aubry M, Herault F, Le Roy P, Berri C, Douaire M, Diot C, Lagarrigue S. Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. BMC Genomics. 2008;9:611.

17. Cogburn LA, Trakooljul N, Chen C, Huang H, Wu CH, Carré W, Wang X, White HB 3rd. Transcriptional profiling of liver during the critical embryo-to-hatchling transition period in the chicken (Gallus gallus). BMC Genomics. 2018;19(1):695.

18. Hicks JA, Porter TE, Sunny NE, Liu HC. Delayed Feeding Alters Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Hepatic Metabolic Pathways in Peri-Hatch Broiler Chicks. Genes (Basel). 2019;10(4):272.

19. Xu E, Zhang L, Yang H, Shen L, Feng Y, Ren M, Xiao Y. Transcriptome profiling of the liver among the prenatal and postnatal stages in chickens. Poult Sci. 2019;98(12):7030-7040.

20. Massimino W, Davail S, Secula A, Andrieux C, Bernadet MD, Pioche T, Ricaud K, Gontier K, Morisson M, Collin A, Panserat S, Houssier M. Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways. BMC Genomics. 2020;21(1):742.

21. Surugihalli C, Farley LS, Beckford RC, Kamkrathok B, Liu HC, Muralidaran V, Patel K, Porter TE, Sunny NE. Remodeling of Hepatocyte Mitochondrial Metabolism and De Novo Lipogenesis During the Embryonic-to-Neonatal Transition in Chickens. Front Physiol. 2022;13:870451.

22. Nangsuay A, Molenaar R, Meijerhof R, van den Anker I, Heetkamp MJ, Kemp B, van den Brand H. Differences in egg nutrient availability, development, and nutrient metabolism of broiler and layer embryos. Poult Sci. 2015;94(3):415-23.

23. Nangsuay A, Meijerhof R, van den Anker I, Heetkamp MJ, Kemp B, van den Brand H. Development and nutrient metabolism of embryos from two modern broiler strains. Poult Sci. 2015;94(10):2546-54.

24. Khaliduzzaman A, Kashimori A, Suzuki T, Ogawa Y, Kondo N. Chick Embryo Growth Modeling Using Near-Infrared Sensor and Non-Linear Least Square Fitting of Egg Opacity Values. Sensors (Basel). 2020;20(20):5888.

25. Hu Q, Agarwal U, Bequette BJ. Gluconeogenesis, non-essential amino acid synthesis and substrate partitioning in chicken embryos during later development. Poult Sci. 2017;96(2):414-424.

26. Surugihalli C, Porter TE, Chan A, Farley LS, Maguire M, Zhang C, Kattapuram N, Muyyarikkandy MS, Liu HC, Sunny NE. Hepatic Mitochondrial Oxidative Metabolism and Lipogenesis Synergistically Adapt to Mediate Healthy Embryonic-to-Neonatal Transition in Chicken. Sci Rep. 2019;9(1):20167.

27. Hicks JA, Porter TE, Liu HC. Identification of microRNAs controlling hepatic mRNA levels for metabolic genes during the metabolic transition from embryonic to posthatch development in the chicken. BMC Genomics. 2017;18(1):687.

28. Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. Physiol Rev. 2014;94(2):355-82.

29. Christensen VL, Grimes JL, Wineland MJ, Davis GS. Accelerating embryonic growth during incubation following prolonged egg storage. 2. Embryonic growth and metabolism. Poult Sci. 2003;82(12):1869-78.

30. Lu JW, McMurtry JP, Coon CN. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. Poult Sci. 2007;86(4):673-83.

31. Reyns GE, Venken K, Morreale de Escobar G, Kühn ER, Darras VM. Dynamics and regulation of intracellular thyroid hormone concentrations in embryonic chicken liver, kidney, brain, and blood. Gen Comp Endocrinol. 2003;134(1):80-7.

32. Too HC, Shibata M, Yayota M, Darras VM, Iwasawa A. Expression of thyroid hormone regulator genes in the yolk sac membrane of the developing chicken embryo. J Reprod Dev. 2017;63(5):463-472.

33. Liu Y, Guo W, Pu Z, Li X, Lei X, Yao J, Yang X. Developmental changes of Insulin-like growth factors in the liver and muscle of chick embryos. Poult Sci. 2016;95(6):1396-402.

34. Burnside J, Cogburn LA. Developmental expression of hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in the chicken. Mol Cell Endocrinol. 1992;89(1-2):91-6.

35. McMurtry JP, Francis GL, Upton Z. Insulin-like growth factors in poultry. Domest Anim Endocrinol. 1997;14(4):199-229.

36. Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. Cell Metab. 2011;13(5):495-504.

37. Tesseraud S, Avril P, Bonnet M, Bonnieu A, Cassar-Malek I, Chabi B, Dessauge F, Gabillard JC, Perruchot MH, Seiliez I. Autophagy in farm animals: current knowledge and future challenges. Autophagy. 2021;17(8):1809-1827.

38. Peng M, Li S, He Q, Zhao J, Li L, Ma H. Proteomics reveals changes in hepatic proteins during chicken embryonic development: an alternative model to study human obesity. BMC Genomics. 2018;19(1):29.

39. Wasserman DH, Cherrington AD. Hepatic fuel metabolism during muscular work: role and regulation. Am J Physiol. 1991;260(6 Pt 1):E811-24.

40. Xing YQ, Li A, Yang Y, Li XX, Zhang LN, Guo HC. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. Life Sci. 2018;193:124-131.

41. Yang S, Wei Z, Wu J, Sun M, Ma Y, Liu G. Proteomic analysis of liver tissues in chicken embryo at Day 16 and Day 20 reveals antioxidant mechanisms. J Proteomics. 2021;243:104258.

42. Tsahar E, Arad Z, Izhaki I, Guglielmo CG. The relationship between uric acid and its oxidative product allantoin: a potential indicator for the evaluation of oxidative stress in birds. J Comp Physiol B. 2006;176(7):653-61.

43. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. J Clin Invest. 2010;120(6):1791-9.

44. Zeng H, Tang C, Lin B, Yu M, Wang X, Wang J, Chen S, Yu C. The regulation effect of GLUT9/SLC2A9 on intrahepatic uric acid level and metabolic associated fatty liver disease. Hepatol Int. 2022;16(5):1064-1074.

45. Ding P, Tong Y, Wu S, Yin X, Liu H, He X, Song Z, Zhang H. The Sexual Effect of Chicken Embryos on the Yolk Metabolites and Liver Lipid Metabolism. Animals (Basel). 2021;12(1):71.

46. Ohtsu H, Sato K, Nishida H, Akiba Y. High beta-hydroxybutyrate concentration in liver and skeletal muscle of newly hatched chicks. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2003;134(3):625-9.

47. Pan N, Wu Y, Yang B, Zhang M, He Y, Wang Z, Tan L, Zhang L. The liver and blood cells are responsible for creatine kinase clearance in blood Circulation: A retrospective study among different human diseases. Clin Chim Acta. 2023;544:117335.

48. Pulikanti R, Peebles ED, Keirs RW, Bennett LW, Keralapurath MM, Gerard PD. Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation. Poult Sci. 2010;89(5):860-5.

49. Koch AJ, Pereira R, Machado M. The creatine kinase response to resistance exercise. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2014;14(1):68-77.

50. Métayer-Coustard S, Tesseraud S, Praud C, Royer D, Bordeau T, Coudert E, Cailleau-Audouin E, Godet E, Delaveau J, Le Bihan-Duval E, Berri C. Early Growth and Protein-Energy Metabolism in Chicken Lines Divergently Selected on Ultimate pH. Front Physiol. 2021;12:643580.

51. Kuroiwa A. Sex-Determining Mechanism in Avians. Adv Exp Med Biol. 2017;1001:19-31.

52. Wang Y, Buyse J, Courousse N, Tesseraud S, Métayer-Coustard S, Berri C, Schallier S, Everaert N, Collin A. Effects of sex and fasting/refeeding on hepatic AMPK signaling in chickens (Gallus gallus). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2020;240:110606.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All procedures used in these experiments were approved by the local ethics committee (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire, Tours, France; permission no APAFIS#30181-202102261132882 and carried out in accordance with current European legislation (EU Directive 2010/63/EU). The use of all our live animals is respectful of animal welfare and has been thought through according to the 3Rs rule (replacement, reduction, refinement). The ARRIVE guidelines were followed while reporting the experiments on animals. The points of the guide (https://arriveguidelines.org/) have been respected. All investigators were certified by the French government to handle animal experiments.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was supported by INRAE.

Authors' contributions

S.M.C., S.T., A.P., C.B. and E.D. conceived and designed the experiments. S.M.C. supervised the study. A.P. and N.C. performed the experiments. A.P., S.M.C. and S.T. analyzed the data. A.P. drafted the first version of the manuscript under the supervision of S.M.C. and S.T. A.C. contributed to the understanding of the results thanks to her expertise in poultry metabolism. All the authors read, enriched and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the staff of UE-PEAT INRAE Poultry Experimental Facility (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12) for producing and rearing animals.

We thank also the technicians Thierry Bordeau, Estelle Cailleau-Audouin, Estelle Godet and Sabine Crochet of the MOQA team (INRAE, UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture, 37380 Nouzilly, France) for measurements on birds, sampling and laboratory analyses.

The authors would also like to thank the researchers and engineers of the BOA unit who contributed to the development of the heatmaps and average expression profiles Amélie

Juanchich and Pierre Blavy as well as the statistician Doulaye Dembele and our GenomEast platform contacts Christelle Thibault-Carpentier and Christelle Morgenthaler-Roth (CERBM GIE – IGBMC, 67404 Illkirch Cedex, France).

Figure legends

Figure 1: Evolution of animal body weight (**A**) and relative liver weight (**B**) from E12 to D8.

The orange color corresponds to the pHu+ line and the blue color to the pHu- line. N = 23 embryos per line at E12; N = 24 embryos per line at E14; N = 16 embryos per line at E18; N = 20 chicks per line at D0; N = 13 pHu+ and 14 pHu- at D8. Data represent means ± s.e.m. Comparisons of means were analyzed by Student's t-test. NS = not significant; *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$.

Figure 2: Changes in the expression of genes involved in hepatic pHu- metabolism between E12 and D8.

Clustering of genes on the heatmap was performed using correlation as a distance measure (**A**). The letters (A to H) correspond to the 8 expression profiles observed. The color gradient from yellow to red indicates over expression, while the color gradient from yellow to blue indicates under expression. The average profile obtained for each cluster is illustrated by a red line (**B**). The dashed lines on the x-axis correspond to the samples. Dotted lines in blue, green and orange show the different stages. Black curves represent genes belonging to the cluster. Cluster A = 3 genes; cluster B = 11 genes; cluster C = 4 genes; cluster D = 11 genes; cluster E = 10 genes; cluster F = 13 genes; cluster G = 6 genes; cluster H = 6 genes. N = 8 pools of three embryos at E12; N = 7 pools of three embryos at E14; N = 8 pools of two embryos at E18; N = 20 chicks at D0; N = 11 chicks at D8.

Figure 3: Changes in the expression of genes involved in hepatic pHu+ metabolism between E12 and D8.

Clustering of genes on the heatmap was performed using correlation as a distance measure (**A**). The numbers (1 to 8) correspond to the 8 expression profiles observed. The color gradient from yellow to red indicates over expression, while the color gradient from yellow to blue indicates under expression. Group 1 (G1) and group 2 (G2) correspond to the two groups of pHu+ for which differences were observed at hatching. The average profile obtained for each cluster is illustrated by a red line (**B**). The dashed lines on the x-axis correspond to the samples. Dotted lines in blue, green and orange show the different stages. Black curves represent genes belonging to the cluster. Cluster 1 = 7 genes; cluster 2 = 12 genes; cluster 3 = 11 genes; cluster 4 = 10 genes; cluster 5 = 6 genes; cluster 6 = 5 genes; cluster 7 = 7 genes; cluster 8 = 6 genes.

N = 8 pools of three embryos at E12 and E14; N = 8 pools of two embryos at E18; N = 20 chicks at D0; N = 11 chicks at D8.

Additional Figure 1: Network representing protein-protein associations of interest at hatching.

The proteins included in the network correspond to genes for which a peak in expression or a transient increase was observed at hatching in both lines. The thickness of the lines indicates the confidence of the associations. Fine line = Between 0.2 and 0.4; Medium line = Between 0.4 and 0.7; Thick line = Between 0.7 and 0.9; Extra thick line = More than 0.9. When the 3D structure of the protein is known or predicted, it appears in the node that is specific to it. Red nodes = glycogen metabolism, yellow nodes = macroautophagy, green nodes = glycogen recognition site of AMP-activated protein kinase, dark blue nodes = cellular response to nutrient levels and light blue nodes = reactive oxygen species metabolic process. SLC25A6 = ANT3 and RPS6KB1 = P70S6K.

Additional Figure 2: Network representing protein-protein associations of interest between groups 1 and 2 (pHu+).

The proteins included in the network correspond to genes for which visual differences were observed in the pHu+ line between G1 and G2, at hatching. The thickness of the lines indicates the confidence of the associations. Fine line = Between 0.2 and 0.4; Medium line = Between 0.4 and 0.7; Thick line = Between 0.7 and 0.9; Extra thick line = More than 0.9. When the 3D structure of the protein is known or predicted, it appears in the node that is specific to it. Red nodes = insulin pathway, yellow nodes = sugar transporters, green nodes = autophagy and blue nodes = glycogen metabolism. CALM2 = PHKD.

Table 1: Relative expression of genes for which differences were observed in pHu+ and pHu- livers at E12 and E14.

Stage	Metabolic pathways	Gene	pHu+	pHu-	Line (P =)
E12	Protein metabolism	*PSMA1*	3.55 ± 0.11	3.16 ± 0.12	**0.03**
		CAPN2	2.75 ± 0.28	2.12 ± 0.21	0.09
		RPTOR	3.02 ± 0.16	2.72 ± 0.06	0.09
		AKT1	3.23 ± 0.08	2.95 ± 0.11	**0.05**
	Carbohydrate metabolism	*PRKAB2*	2.27 ± 0.07	2.01 ± 0.07	**0.02**
		PRKAG1	3.40 ± 0.07	3.13 ± 0.05	**0.008**
		PHKA1	2.97 ± 0.28	2.37 ± 0.15	0.08
		PHKB	2.30 ± 0.06	2.14 ± 0.06	0.08
		PHKG1	2.00 ± 0.08	1.80 ± 0.07	0.08
	Mitochondrial activity	*COX4I1*	2.98 ± 0.08	2.63 ± 0.07	**0.004**
		CS	4.13 ± 0.14	3.52 ± 0.21	**0.03**
		ANT3	2.13 ± 0.06	1.95 ± 0.04	**0.02**
	Autophagy	*SQSTM1*	1.52 ± 0.05	1.38 ± 0.04	**0.05**
	Growth - Development	*IGF2*	1.69 ± 0.06	1.51 ± 0.04	**0.03**
	Cell growth - Differentiation	*IFRD1*	2.04 ± 0.13	2.41 ± 0.07	**0.02**
E14	Protein metabolism	*PSMA1*	3.16 ± 0.08	2.88 ± 0.11	0.06
		CAPN2	3.34 ± 0.16	2.79 ± 0.11	**0.02**
		RPTOR	2.97 ± 0.05	2.62 ± 0.09	**0.004**
		SLC2A9	1.83 ± 0.10	1.42 ± 0.11	**0.01**
	Carbohydrate metabolism	*PRKAB2*	2.64 ± 0.04	2.20 ± 0.15	**0.008**
		PRKAG1	3.08 ± 0.09	2.85 ± 0.08	0.09
		GSK3	2.58 ± 0.04	2.43 ± 0.08	0.09
		SLC2A1	3.52 ± 0.10	3.08 ± 0.22	0.08
	Lipid metabolism	*PPARG*	1.16 ± 0.05	0.98 ± 0.03	**0.008**
		CPT1A	2.45 ± 0.06	1.87 ± 0.13	**0.001**
	Mitochondrial activity	*COX4I1*	2.78 ± 0.06	2.40 ± 0.09	**0.002**
		ANT3	2.18 ± 0.05	1.87 ± 0.07	**0.003**
		PGC1A	3.65 ± 0.20	3.06 ± 0.19	**0.05**
	Autophagy	*SQSTM1*	1.78 ± 0.07	1.47 ± 0.07	**0.009**
		ATG4B	2.72 ± 0.06	2.50 ± 0.07	**0.03**
	Antioxidant system	*SOD2*	1.83 ± 0.21	2.66 ± 0.19	**0.01**
	Cell growth - Differentiation	*IFRD1*	1.99 ± 0.07	2.37 ± 0.07	**0.002**

Data represent means ± s.e.m. and are expressed in arbitrary units. Comparisons of means were analyzed by Student's t-test. Values in bold indicate significant differences between pHu+ and pHu- ($P \leq 0.05$). The threshold value for trends was $P < 0.10$. Gene names are listed in Additional Table 2.

Table 2: Relative expression of genes for which differences were observed in pHu+ and pHu- livers from E18 to D8.

Stage	Metabolic pathways	Gene	pHu+	pHu-	Line (P =)
E18	Carbohydrate metabolism	*G6PC2*	3.94 ± 0.11	3.18 ± 0.22	**0.008**
		FoxO1	2.20 ± 0.10	2.56 ± 0.13	**0.05**
	Lipid metabolism	*ACOX1*	0.84 ± 0.03	1.07 ± 0.05	**0.001**
	Antioxidant system	*SOD2*	1.22 ± 0.19	1.98 ± 0.20	**0.02**
	Cell growth - Differentiation	*IFRD1*	2.23 ± 0.10	2.64 ± 0.17	**0.05**
D0	Carbohydrate metabolism	*PRKAB2*	3.10 ± 0.07	3.28 ± 0.07	0.08
		PRKAG2	1.48 ± 0.03	1.69 ± 0.03	**< 0.0001**
		SLC2A8	2.20 ± 0.04	2.41 ± 0.04	**0.0008**
	Lipid metabolism	*CPT1A*	1.52 ± 0.07	1.86 ± 0.12	**0.02**
		HADH	2.45 ± 0.06	2.63 ± 0.08	0.08
		CD36	2.59 ± 0.09	2.92 ± 0.10	**0.02**
		SREBP1	4.08 ± 0.17	3.29 ± 0.23	**0.008**
	Autophagy	*UVRAG*	2.40 ± 0.07	2.70 ± 0.11	**0.03**
	Antioxidant system	*SOD2*	2.53 ± 0.23	3.05 ± 0.19	0.09
	Cell growth - Differentiation	*IFRD1*	2.00 ± 0.10	2.50 ± 0.07	**0.0003**
D8	Protein metabolism	*SLC2A9*	1.54 ± 0.07	1.72 ± 0.05	**0.05**
	Carbohydrate metabolism	*PHKB*	3.04 ± 0.07	3.49 ± 0.10	**0.002**
		PHKD	1.94 ± 0.09	2.22 ± 0.12	0.08
		PRKAA1	2.14 ± 0.07	2.51 ± 0.16	**0.04**
		PRKAG2	1.62 ± 0.07	1.98 ± 0.13	**0.03**
		SLC2A2	1.88 ± 0.12	1.54 ± 0.06	**0.02**
		FoxO1	2.01 ± 0.06	2.28 ± 0.09	**0.02**
	Antioxidant system	*CAT*	2.07 ± 0.09	1.77 ± 0.06	**0.01**
	Thyroid hormone regulation	*DIO3*	0.03 ± 0.005	0.07 ± 0.02	**0.03**

Data represent means ± s.e.m. and are expressed in arbitrary units. Comparisons of means were analyzed by Student's t-test. Values in bold indicate significant differences between pHu+ and pHu- ($P \leq 0.05$). The threshold value for trends was $P < 0.10$. Gene names are listed in Additional Table 2.

Table 3: Relative expression of genes for which a sex effect was observed in the liver at D0.

Metabolic pathways	Genes	Male	Female	Sex (P =)
Protein metabolism	*RPS6*	2.99 ± 0.13	2.14 ± 0.10	**< 0.0001**
Carbohydrate metabolism	*PRKAA1*	3.52 ± 0.19	2.85 ± 0.21	**0.02**
	SLC2A1	2.36 ± 0.06	2.52 ± 0.07	0.09
	SLC2A8	2.37 ± 0.04	2.23 ± 0.05	**0.03**
	FoxO1	2.70 ± 0.14	3.13 ± 0.21	0.09
Lipid metabolism	*PPARG*	1.71 ± 0.06	1.51 ± 0.05	**0.01**
	ACAA2	3.32 ± 0.13	2.13 ± 0.11	**< 0.0001**
Mitochondrial activity	*PGC1A*	2.14 ± 0.10	2.53 ± 0.16	**0.04**
	COX4I1	3.08 ± 0.05	2.91 ± 0.07	0.06
Autophagy	*ATG12*	6.62 ± 0.34	4.63 ± 0.26	**< 0.0001**
Growth - development	*IGF2*	4.52 ± 0.29	3.86 ± 0.21	0.08
Thyroid hormone regulation	*DIO1*	3.14 ± 0.06	2.81 ± 0.06	**0.0003**

Data represent means ± s.e.m. and are expressed in arbitrary units. Data were analyzed by Student's t-test. Values in bold indicate significant differences ($P \leq 0.05$). The threshold value for trends was $P < 0.10$. N = 20 chicks per line (10 females and 10 males). No line*sex interaction was noted. Gene names are listed in Additional Table 2.

Table 4: Relative expression of genes for which a sex effect was observed in the liver at D8.

Metabolic pathways	Genes	Male	Female	Sex (P =)
Protein metabolism	*RPS6*	2.49 ± 0.04	1.77 ± 0.09	**< 0.0001**
Carbohydrate metabolism	*PRKAA1*	2.52 ± 0.11	2.17 ± 0.13	**0.05**
	PRKAB2	2.30 ± 0.08	2.55 ± 0.11	0.09
	PHKA2	2.93 ± 0.16	3.32 ± 0.10	**0.04**
	PHKB	3.05 ± 0.10	3.44 ± 0.09	**0.007**
	GYS2	1.44 ± 0.10	1.72 ± 0.11	0.07
	SLC5A1	6.10 ± 0.74	4.78 ± 0.25	0.08
	SLC2A12	4.33 ± 0.31	5.45 ± 0.34	**0.03**
Lipid metabolism	*ACOX1*	1.59 ± 0.05	1.43 ± 0.06	0.07
	ACAA2	2.00 ± 0.11	1.36 ± 0.09	**0.0003**
Autophagy	*ATG12*	2.89 ± 0.15	2.23 ± 0.15	**0.005**
Thyroid hormone regulation	*DIO1*	2.72 ± 0.10	2.40 ± 0.11	**0.05**

Data represent means ± s.e.m. and are expressed in arbitrary units. Data were analyzed by Student's t-test. Values in bold indicate significant differences ($P \leq 0.05$). The threshold value for trends was $P < 0.10$. N = 11 chicks per line (6 females and 5 males). No line*sex interaction was noted. Gene names are listed in Additional Table 2.

Table 5: Comparison of phenotypic characteristics between pHu- and pHu+ (G1 and G2) at D0.

	pHu-	**pHu+ (G1)**	**pHu+ (G2)**	**Group (P =)**
Chick weight (g)	36.3 ± 0.35 [b]	38.8 ± 0.63 [a]	37.8 ± 0.62 [a]	**0.003**
Residual yolk sac weight (g)	2.75 ± 0.25	3.35 ± 0.29	3.18 ± 0.23	0.25
Liver weight (g)	0.80 ± 0.01 [b]	0.88 ± 0.02 [a]	0.78 ± 0.03 [b]	**0.007**
Residual yolk sac / chick weight (%)	7.52 ± 0.65	8.60 ± 0.67	8.39 ± 0.59	0.48
Liver / chick weight (%)	2.20 ± 0.04 [ab]	2.26 ± 0.04 [a]	2.07 ± 0.07 [b]	**0.05**
Glucose (mg/L)	1920 ± 23	1872 ± 43	1902 ± 34	0.57
Uric acid (mg/L)	68.9 ± 7.6	56.2 ± 4.7	73.0 ± 7.7	0.40
Triglycerides (mg/L)	490 ± 33 [ab]	615 ± 81 [a]	407 ± 46 [b]	**0.04**
Non-esterified fatty acids (µmol/L)	380 ± 18	391 ± 26	323 ± 15	0.07
Hydroxybutyrate (mmol/L)	2.34 ± 0.09 [a]	2.24 ± 0.17 [ab]	1.88 ± 0.12 [b]	**0.03**
Creatine kinase activity (UI/L)	4289 ± 857 [c]	30775 ± 7666 [a]	16233 ± 4600 [b]	**<0.0001**
Total antioxidant status (mmol/L)	1.06 ± 0.07	1.04 ± 0.06	1.11 ± 0.07	0.82
Liver glycolytic potential (µmol/g) *	108 ± 8	116 ± 13	97 ± 11	0.49

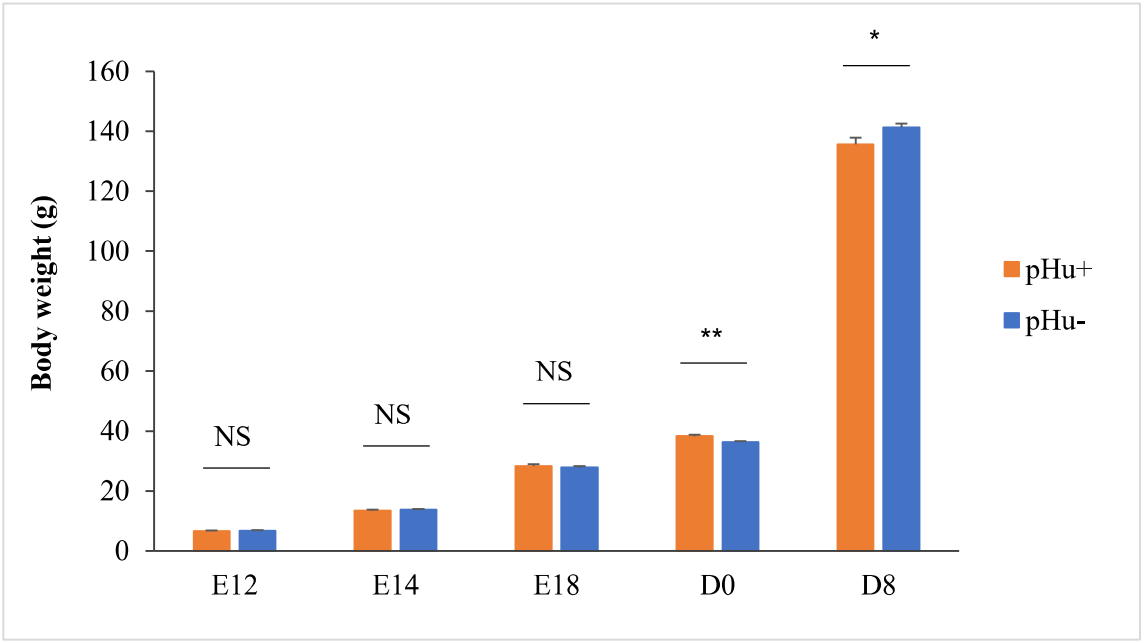
Phenotypic characterization includes weight, serum and tissue parameters. Data represent means ± s.e.m. Data were analyzed by ANOVA and multiple comparisons by a Tukey test. Values in bold indicate significant differences ($P \leq 0.05$). Letters [a b c] correspond to significant differences. The threshold value for trends was $P < 0.10$. N = 20 chicks per line. N = 9 chicks in group 1 (G1) and N = 11 chicks in group 2 (G2), G1 and G2 being considered as two distinct groups of pHu+ by hierarchical clustering of samples. * = equivalent lactate.

Table 6: Comparison of phenotypic characteristics between pHu- and pHu+ at D8.

	pHu+		pHu-		Line	Sex
	Male	**Female**	**Male**	**Female**		
Chick weight (g)	135 ± 4	136 ± 3	141 ± 3	141 ± 2	**0.04**	0.59
Liver weight (g)	5.2 ± 0.2	5.8 ± 0.4	5.7 ± 0.2	6.2 ± 0.3	0.10	0.06
Liver / chick weight (%)	3.8 ± 0.1	4.2 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.2	0.28	**0.04**
Glucose (mg/L)	3839 ± 489	2683 ± 164	3874 ± 717	2712 ± 114	0.61	**0.005**
Uric acid (mg/L)	115 ± 11	98 ± 7	138 ± 13	115 ± 10	0.15	0.14
Triglycerides (mg/L)	2145 ± 293	2082 ± 179	2094 ± 244	2165 ± 115	0.91	0.97
Non-esterified fatty acids (µmol/L)	237.7 ± 12.7	241.4 ± 29.1	226.0 ± 13.3	226.2 ± 9.7	0.41	0.91
Hydroxybutyrate (mmol/L)	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.04	0.63 ± 0.12	0.40 ± 0.05	**0.006**	0.45
Creatine kinase activity (UI/L)	3257 ± 264	3075 ± 414	3488 ± 611	3725 ± 262	0.20	0.70
Total antioxidant status (mmol/L)	1.70 ± 0.12	1.57 ± 0.08	1.83 ± 0.11	1.60 ± 0.10	0.57	0.11
Liver glycolytic potential (µmol/g) *	1556 ± 88	1718 ± 113	1760 ± 94	1922 ± 75	0.06	0.15

Phenotypic characterization includes weight, serum and tissue parameters. Data represent means ± s.e.m. Data were analyzed by a two-way ANOVA. No significant interaction was observed. Values in bold indicate significant differences ($P \leq 0.05$). The threshold value for trends was $P < 0.10$. N = 14 pHu- (9 females and 5 males) and N = 13 pHu+ (6 females and 7 males). * = equivalent lactate.

A


Body weight (g)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NS
NS
NS
**
*
E12
E14
E18
D0
D8
pHu+
pHu-

B

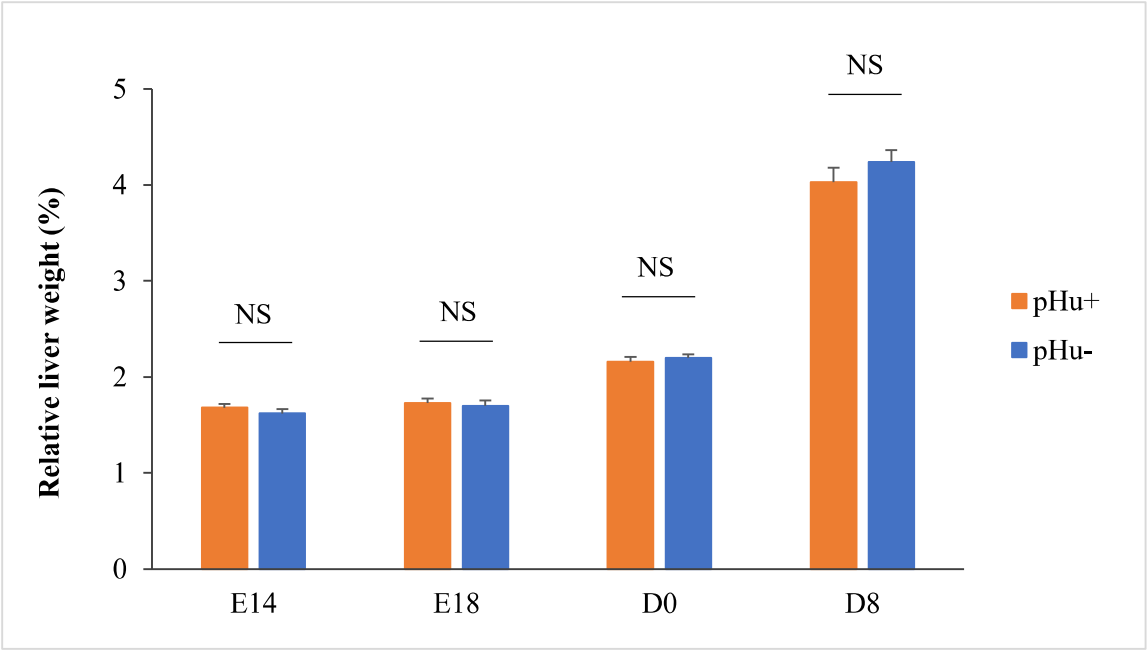

Relative liver weight (%)
5
4
3
2
1
0
NS
NS
NS
NS
E14
E18
D0
D8
pHu+
pHu-

Figure 1

A (pHu-)

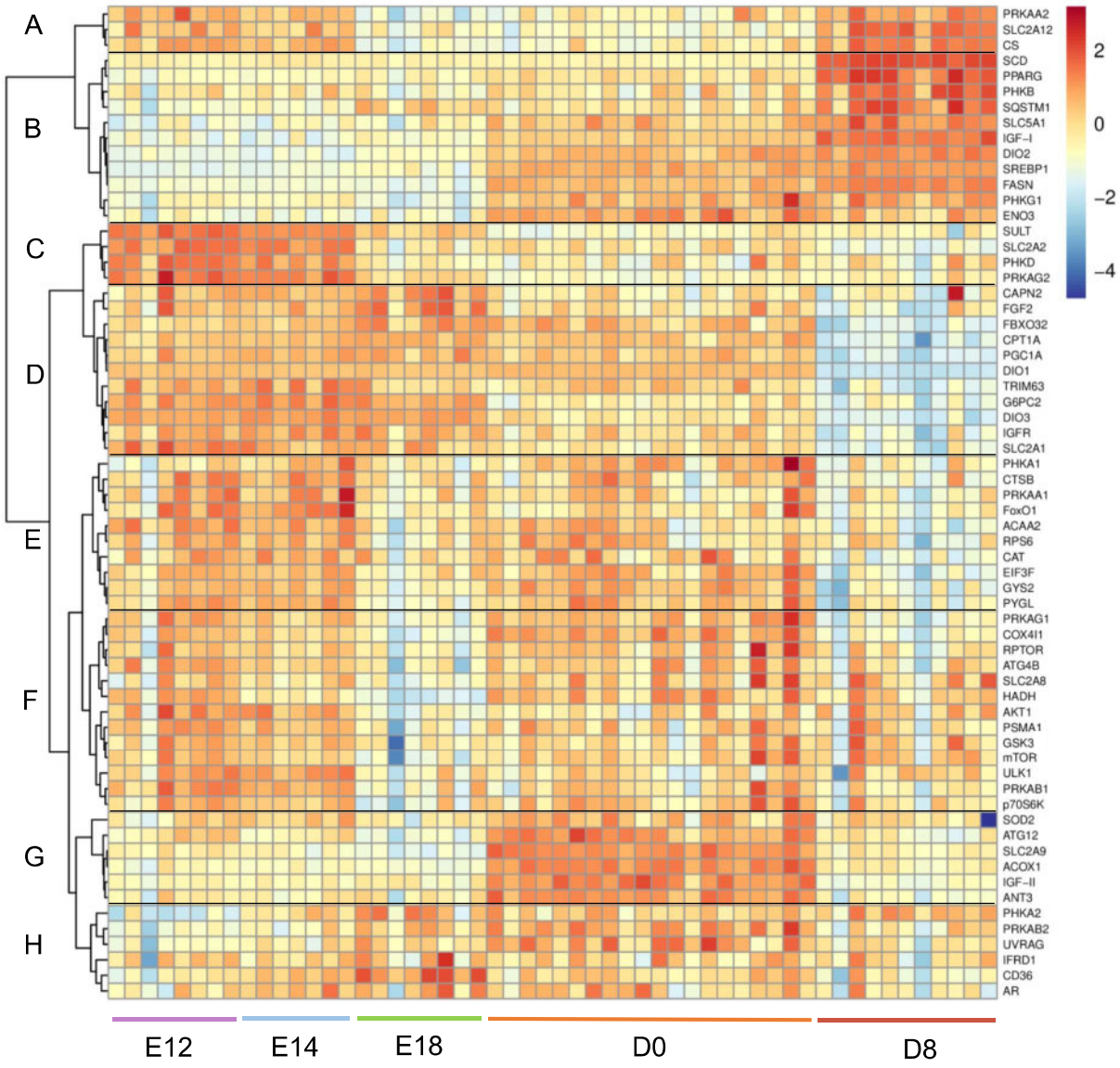


Figure 2

B

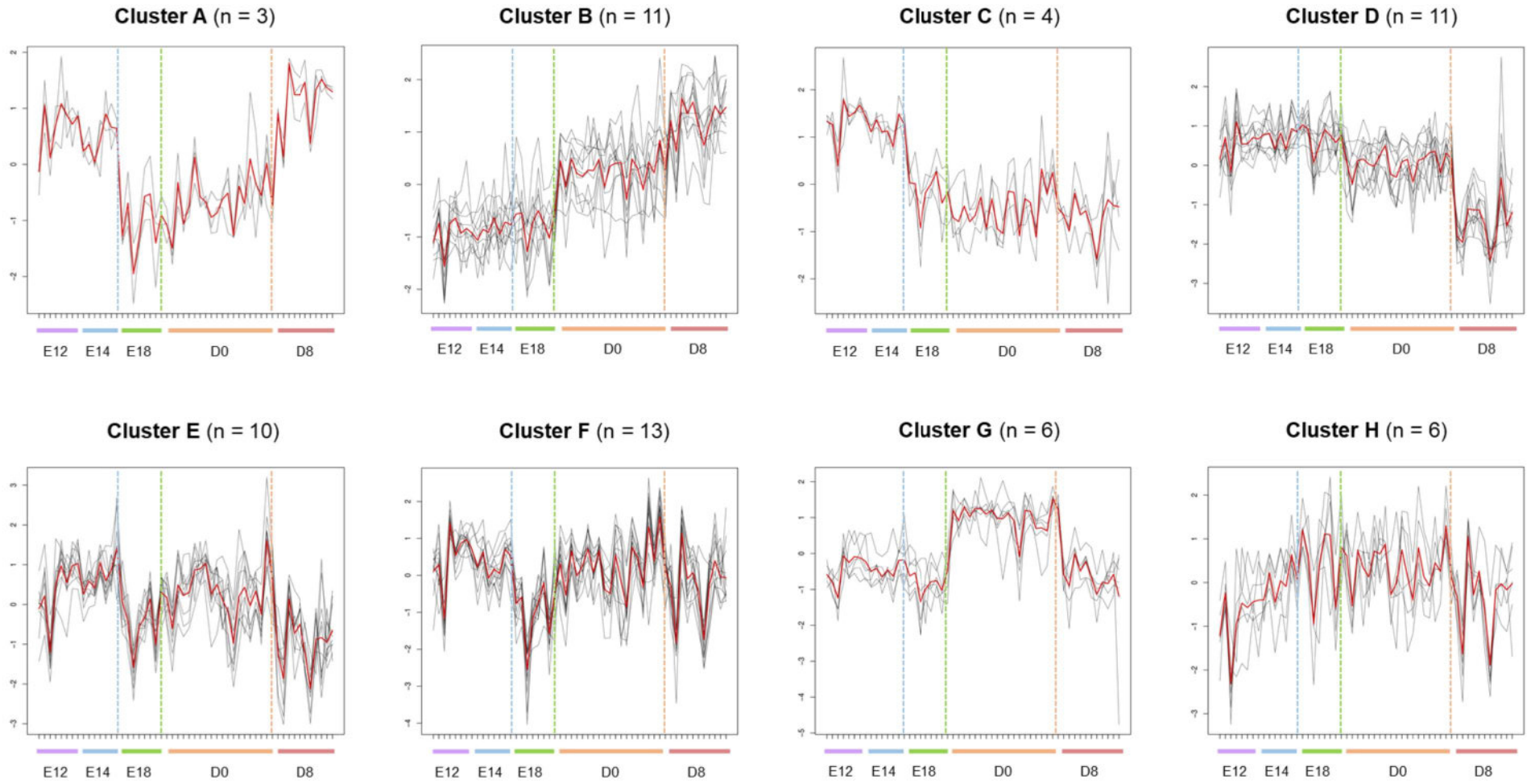

Cluster A (n = 3)
Cluster B (n = 11)
Cluster C (n = 4)
Cluster D (n = 11)
Cluster E (n = 10)
Cluster F (n = 13)
Cluster G (n = 6)
Cluster H (n = 6)
E12
E14
E18
D0
D8

Figure 2

A (pHu+)

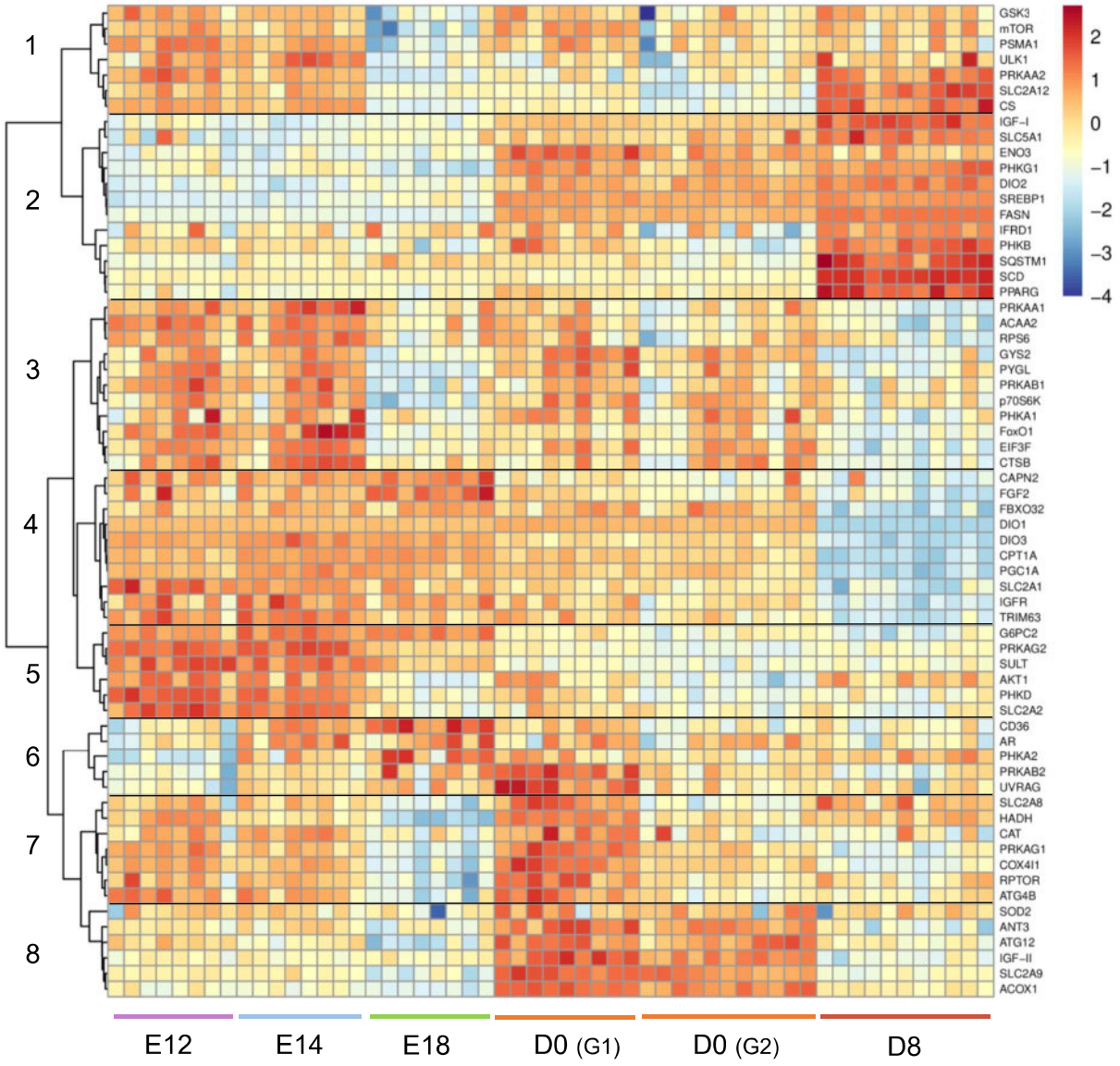


Figure 3

B

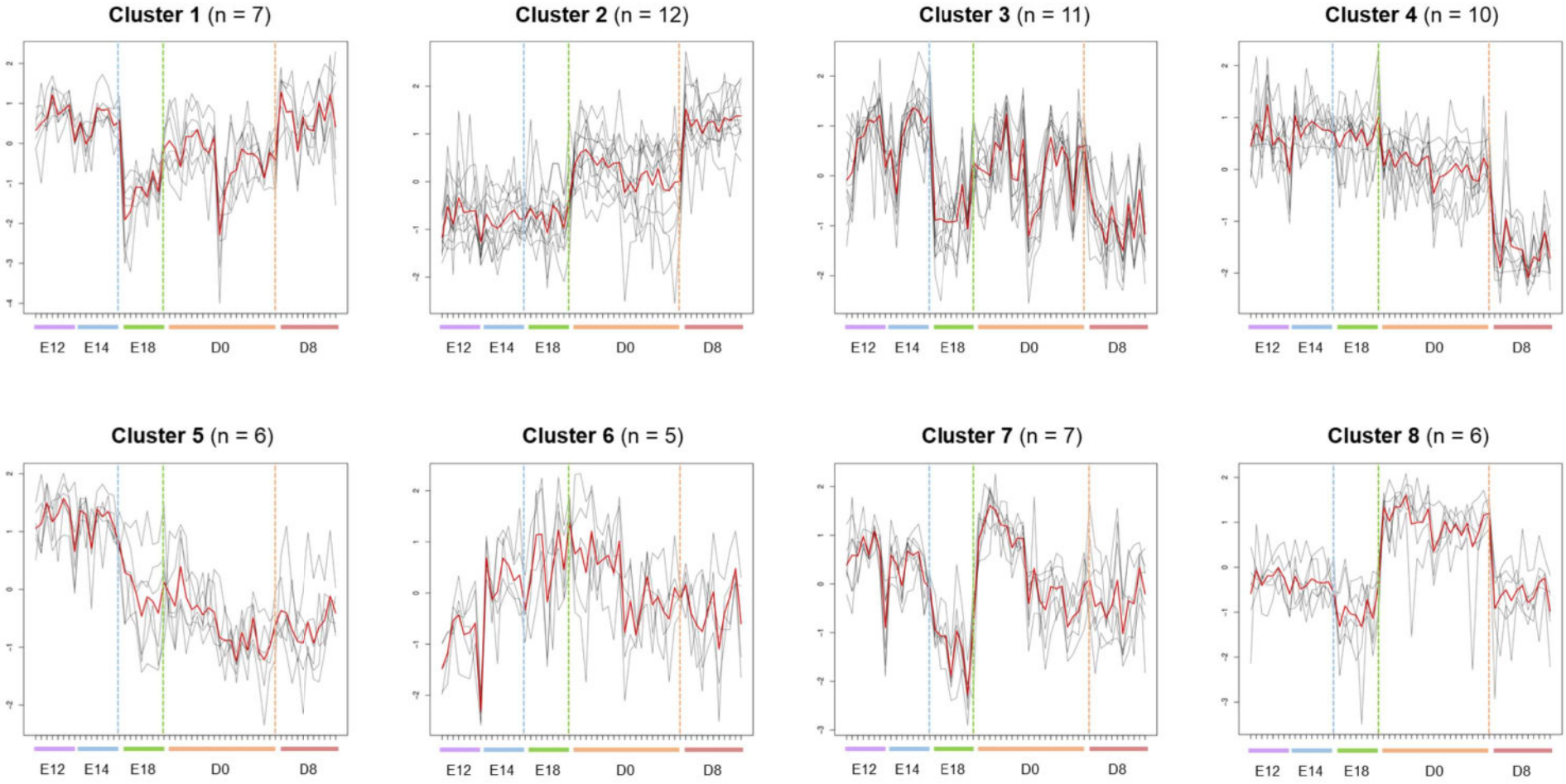
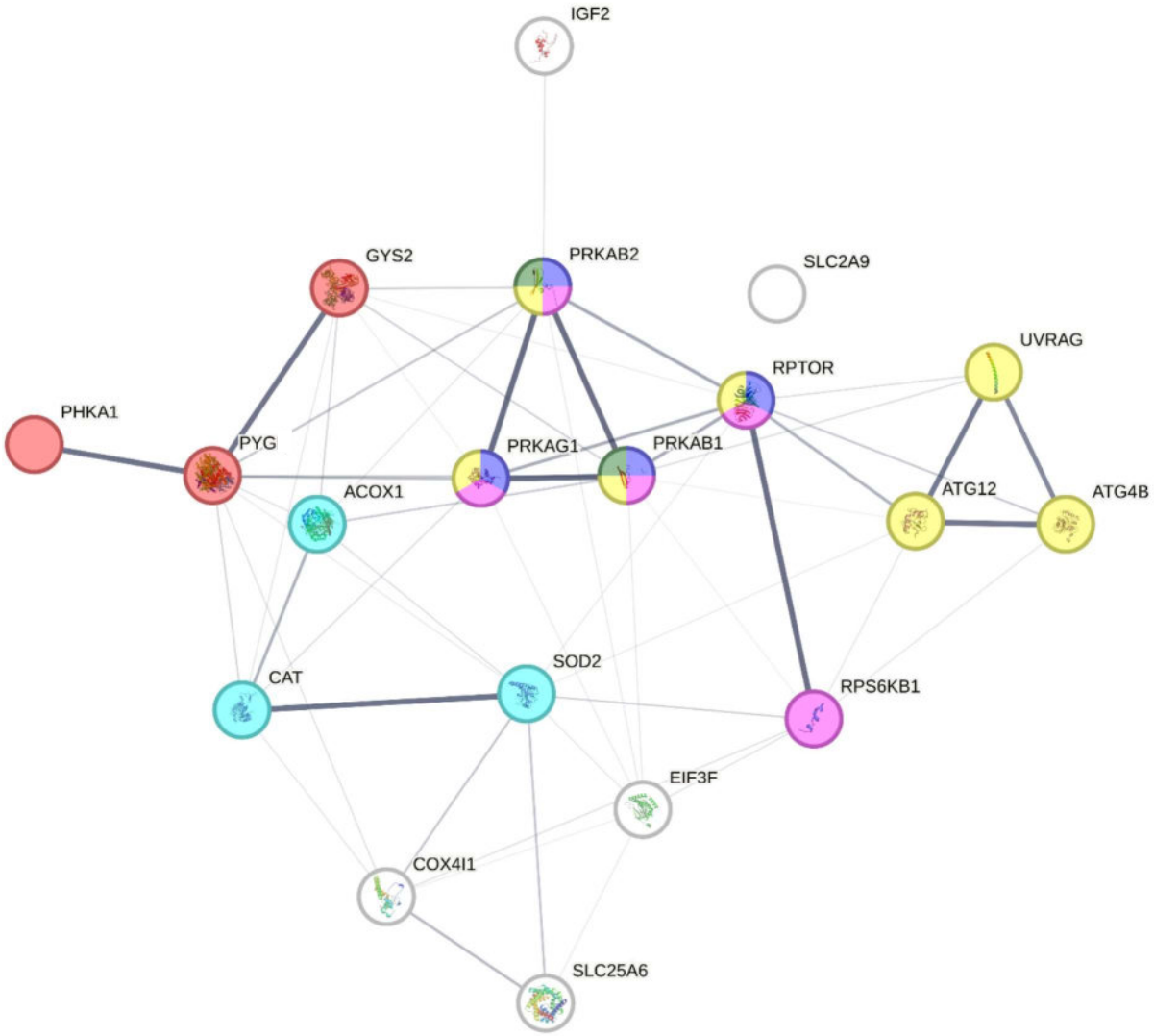
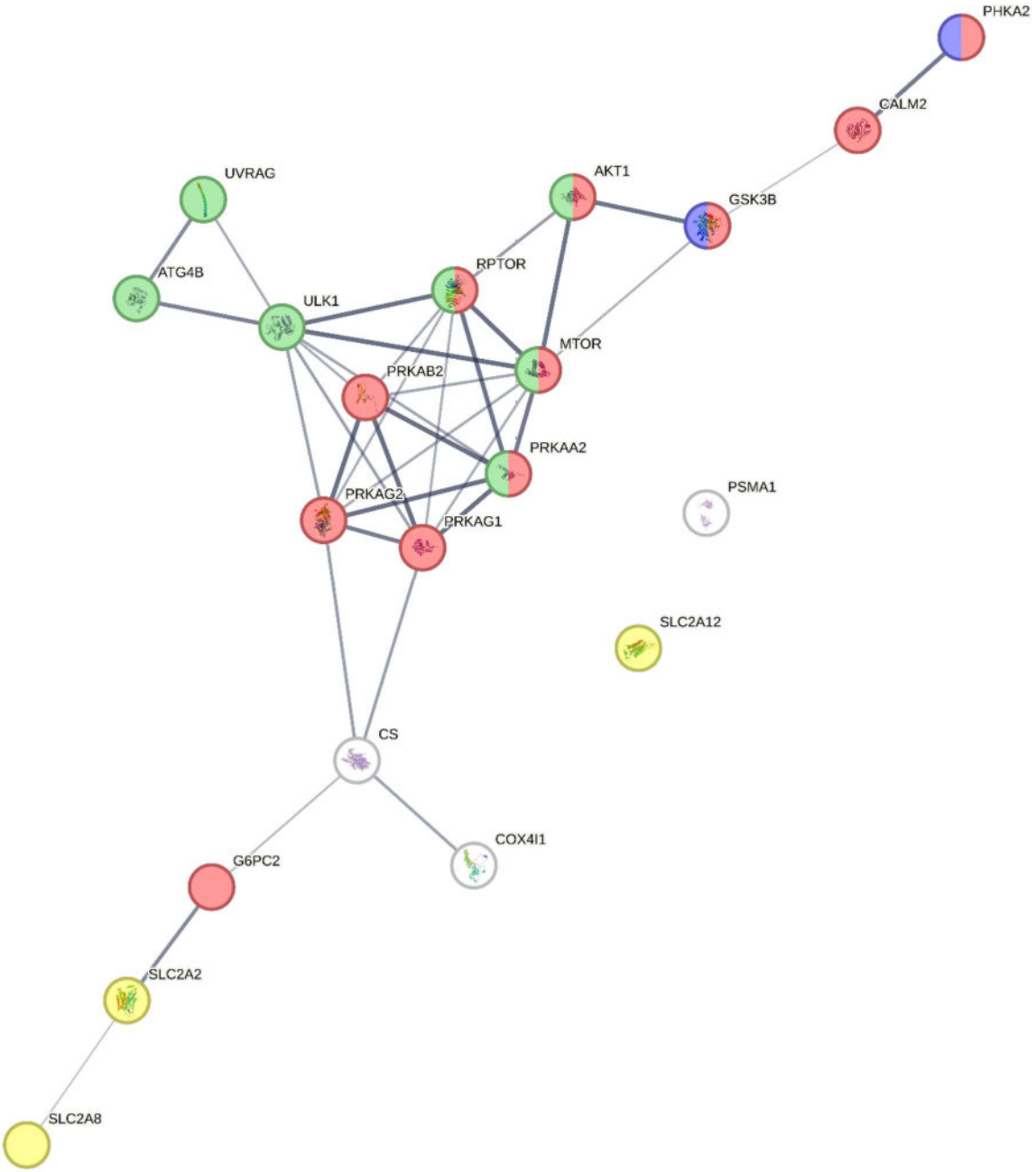

Cluster 1 (n = 7)
Cluster 2 (n = 12)
Cluster 3 (n = 11)
Cluster 4 (n = 10)
Cluster 5 (n = 6)
Cluster 6 (n = 5)
Cluster 7 (n = 7)
Cluster 8 (n = 6)
E12
E14
E18
D0
D8

Figure 3



Additional Figure 1



Additional Figure 2

pHu-	Gene	pHu+
Cluster A	*PRKAA2*	Cluster 1
	SLC2A12	
	CS	
Cluster B	*SCD*	Cluster 2
	PPARG	
	PHKB	
	SQSTM1	
	SLC5A1	
	IGF-1	
	DIO2	
	SREBP1	
	FASN	
	PHKG1	
	ENO3	
Cluster C	*SULT*	Cluster 5
	SLC2A2	
	PHKD	
	PRKAG2	
Cluster D	*G6PC2*	Cluster 5
	CAPN2	Cluster 4
	FGF2	
	FBXO32	
	CPT1A	
	PGC1A	
	DIO1	
	TRIM63	
	DIO3	
	IGFR	
	SLC2A1	
Cluster E	*PHKA1*	Cluster 3
	CTSB	
	PRKAA1	
	FoxO1	
	ACAA2	
	RPS6	
	EIF3F	
	GYS2	
	PYGL	
	CAT	Cluster 7
Cluster F	*PRKAG1*	Cluster 7
	COX4I1	
	RPTOR	
	ATG4B	
	SLC2A8	
	HADH	
	AKT1	Cluster 5
	PSMA1	Cluster 1
	GSK3	
	mTOR	
	ULK1	
	PRKAB1	Cluster 3
	P70S6K	
Cluster G	*SOD2*	Cluster 8
	ATG12	
	SLC2A9	
	ACOX1	
	IGF-II	
	ANT3	
Cluster H	*PHKA2*	Cluster 6
	PRKAB2	
	UVRAG	
	CD36	
	AR	
	IFRD1	Cluster 2

Additional Table 1

Voies et fonctions métaboliques	Nom des gènes	Abbréviations	Références
Protein metabolism	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	*EIF3F*	XM_421624.5
	AKT serine/threonine kinase	*AKT1*	NM_205055.1
	Target of rapamycin	*mTOR*	XM_417614.6
	Regulatory associated protein of MTOR complex 1	*RPTOR*	NC_052549.1
	Ribosomal protein S6 kinase (70 kDa)	*p70S6K (RPS6KB1)*	NM_001030721.2
	Ribosomal protein S6	*RPS6*	NM_205225.2
	Calpain 2	*CAPN2*	NM_205080.1 / D38026.1
	Cathepsin B	*CTSB*	NM_205371.2
	Proteasome component C2 / Proteasome subunit alpha type-1	*PSMA1*	NM_205020.1 / AF027978
	RING-type E3 ubiquitin transferase	*TRIM63 (MURF-1)*	NC_052554.1
	F-box protein 32	*FBXO32 (Atrogin-1)*	NM_001389309.1
	Solute carrier family 2 member 9	*SLC2A9*	XM_420789.6
Carbohydrate metabolism	Forkhead box O1	*FoxO1*	NM_204328.1
	Enolase 3	*ENO3*	NM_205119.1
	Solute carrier family 2 member 1	*SLC2A1*	NM_205209.1
	Solute carrier family 2 member 2	*SLC2A2*	NM_207178.1
	Solute carrier family 2 member 8	*SLC2A8*	NM_204375.1
	Solute carrier family 2 member 12	*SLC2A12*	XM_419733.6
	Solute carrier family 5 member 1	*SLC5A1*	NM_001293240.1
	Glycogen synthase 2	*GYS2*	XM_040705655.1
	Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit 2	*G6PC2*	XM_422017.5
	Glycogen synthase kinase 3	*GSK3*	NC_052532.1
	Glycogen phosphorylase, liver form	*PYGL*	NM_204392.1
	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	*PRKAA1*	NM_001039603.1
	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2	*PRKAA2*	NM_001039605.1
	Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 1	*PRKAB1*	NM_001039912.1
	Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2	*PRKAB2*	NM_001044662.1
	Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1	*PRKAG1*	NM_001034827.2
	Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2	*PRKAG2*	NM_001030965.2
	Phosphorylase kinase regulatory subunit alpha 1	*PHKA1*	NC_006091
	Phosphorylase kinase regulatory subunit alpha 2	*PHKA2*	XM_004934687.4
	Phosphorylase kinase regulatory subunit beta	*PHKB*	NM_001007831.1
	Calmodulin 1	*PHKD (CALM1)*	NM_001110364.1
	Phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 1	*PHKG1*	NM_001006217.2
Lipid metabolism	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	*PPARG*	NM_001001460.1
	Fatty acid synthase	*FASN*	NM_205155.3
	Stearoyl-CoA desaturase	*SCD*	NM_204890.1
	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	*SREBP1*	NM_204126.3
	Carnitine palmitoyltransferase 1A	*CPT1A*	NM_001012898.1
	Acyl-CoA oxidase 1	*ACOX1*	NM_001006205.1
	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	*HADH*	NM_001277897.2
	Acetyl-CoA acyltransferase 2	*ACAA2*	NM_001006571.2
	CD36 molecule	*CD36*	NM_001030731.1

Lipid metabolism	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	*PPARG*	NM_001001460.1
	Fatty acid synthase	*FASN*	NM_205155.3
	Stearoyl-CoA desaturase	*SCD*	NM_204890.1
	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	*SREBP1*	NM_204126.3
	Carnitine palmitoyltransferase 1A	*CPT1A*	NM_001012898.1
	Acyl-CoA oxidase 1	*ACOX1*	NM_001006205.1
	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	*HADH*	NM_001277897.2
	Acetyl-CoA acyltransferase 2	*ACAA2*	NM_001006571.2
	CD36 molecule	*CD36*	NM_001030731.1
Mitochondrial activity	Cytochrome C Oxidase Subunit 4I1	*COX4I1*	NM_001030577.2
	Citrate Synthase	*CS*	NC_052565.1
	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha	*PGC1A (PPARG1A)*	NM_001006457.2
	ADP/ATP Translocase 3	*ANT3 (SLC25A6)*	NM_204231.3
Autophagy	unc-51 like autophagy activating kinase 1	*ULK1*	NC_052546.1
	UV radiation resistance associated	*UVRAG*	NM_001030839.1
	Autophagy related 12	*ATG12*	NC_052572.1
	Autophagy related 4B cysteine peptidase	*ATG4B*	NM_213573.1
	Sequestosome 1	*SQSTM1*	XM_001233248.5
Antioxidant system	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	*SOD2*	NM_204211.1
	Catalase	*CAT*	NM_001031215.2
Growth and development	Insulin like growth factor 1	*IGF1*	NM_001004384.2
	Insulin like growth factor 2	*IGF2*	NM_001030342.3
	Insulin like growth factor 1 receptor	*IGF1R*	NM_205032.2 / AJ223164.1
Cell growth and differentiation	Interferon related developmental regulator 1	*IFRD1*	NM_001001468.1
	Fibroblast growth factor 2	*FGF2*	NM_205433.1
	Androgen receptor	*AR*	NM_001040090.1
Thyroid hormone regulation	Deiodinase, iodothyronine type I	*DOI1*	NM_001097614.1
	Deiodinase, iodothyronine type II	*DOI2*	NM_204114.4
	Deiodinase, iodothyronine type III	*DOI3*	NM_001122648.2
Metabolism of catecholamines & thyroid/steroid hormones	Sulfotransferase	*SULT*	NM_205060.1

Additional Table 2

II. Le muscle

INTRODUCTION

Dans le modèle pHu, la sélection génétique a été initiée sur le pH ultime du muscle *Pectoralis major*, constitué de fibres à contraction rapide dont le métabolisme est purement glycolytique. D'après Beauclercq et al. (2015), la sélection a conduit à une réorientation partielle du métabolisme énergétique des muscles, sans modification notoire de leur typologie, et à une modification de l'expression des gènes *PRKAG3* (*AMPK γ3*) et *PHKB*, deux enzymes directement impliquées dans le turnover du glycogène musculaire. Comme décrit dans la démarche expérimentale du mémoire, les pHu- se caractérisent par une utilisation intensive du métabolisme des glucides tandis que les pHu+ ont recourt à la protéolyse musculaire, au catabolisme des acides aminés et à la β-oxydation des acides gras, pour produire de l'énergie (Beauclercq et al., 2016 ; Beauclercq et al., 2017). D'après Liu et al. (2016), le métabolisme protéique et énergétique sont étroitement liés. Pendant le développement des muscles squelettiques, l'énergie issue de la glycolyse et/ou de la néoglucogenèse est utilisée pour le renouvellement des protéines. Le métabolisme des lipides contribue quant à lui au développement et à la croissance des muscles via la β-oxydation des acides gras et les dépôts de graisse intramusculaire (Liu et al., 2018). La masse musculaire et l'accumulation de graisse intramusculaire sont toutes deux déterminées par le nombre de cellules/fibres et la taille de ces dernières (Liu et al., 2017). La période embryonnaire est associée à l'hyperplasie correspondant à l'augmentation du nombre de fibres musculaires tandis que la période post-éclosion est associée à l'hypertrophie, c'est-à-dire à l'augmentation de la taille des fibres (Liu et al., 2020).

La période périnatale étant particulièrement sensible à la disponibilité en nutriments et métabolites bioactifs, l'objectif de notre étude consiste à décrire les voies et fonctions métaboliques régissant le métabolisme musculaire des lignées pHu+ et pHu- en fonction de l'environnement nutritionnel *in ovo* et post-éclosion. Les prélèvements de muscle *Pectoralis major* et les mesures d'expression de gènes ont été réalisés sur le même dispositif expérimental et le même protocole que pour le foie.

RESULTATS ET DISCUSSION

Caractérisation phénotypique des lignées pHu entre E12 et J8

Tableau 2 : Evolution des paramètres pondéraux au cours du développement pré- et post-éclosion des lignées pHu+ et pHu-.

	pHu+	**pHu-**	**P =**
E12			
Poids de l'animal (g)	6,60 ± 0,18	6,67 ± 0,25	NS
Poids du muscle *Pectoralis major* (g)	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	NS
Rendement en muscle (%)	1,14 ± 0,06	1,15 ± 0,08	NS
E14			
Poids de l'animal (g)	13,5 ± 0,40	13,7 ± 0,29	NS
Poids du muscle *Pectoralis major* (g)	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	NS
Rendement en muscle (%)	2,50 ± 0,06	2,44 ± 0,06	NS
E18			
Poids de l'animal (g)	28,3 ± 0,67	27,8 ± 0,52	NS
Poids du muscle *Pectoralis major* (g)	0,45 ± 0,01	0,42 ± 0,01	NS
Rendement en muscle (%)	1,57 ± 0,03	1,52 ± 0,05	NS
J0			
Poids de l'animal (g)	38,3 ± 0,45	36,3 ± 0,35	**0,001**
Poids du muscle *Pectoralis major* (g)	0,46 ± 0,02	0,40 ± 0,01	**0,015**
Rendement en muscle (%)	1,20 ± 0,04	1,12 ± 0,04	NS
J8			
Poids de l'animal (g)	135,7 ± 2,23	141,3 ± 1,26	**0,035**
Poids du muscle *Pectoralis major* (g)	7,06 ± 0,26	6,98 ± 0,26	NS
Rendement en muscle (%)	5,19 ± 0,14	4,94 ± 0,18	NS

Les données représentant des moyennes ± S.E.M. ont été analysées par un test de Student. Les valeurs en gras indiquent les différences significatives ($P \leq 0,05$). La valeur seuil pour les tendances est $P < 0,10$. Aucun effet sexe n'a été observé. Effet âge < 0,0001 pour les trois paramètres. Interaction lignée*âge < 0,0001 pour le poids de l'animal et NS pour le reste. N = 23 par lignée à E12 et E14, N = 16 par lignée à E18, N = 20 par lignée à J0, N = 13 pHu+ et 14 pHu- à J8.

Alors que le poids des embryons a augmenté de manière significative tout au long de la cinétique, le poids du muscle *Pectoralis major* a augmenté entre E12 et 18 puis entre J0 et J8 (**Tableau 2**). Sur la période E18-J0, le poids du muscle est resté relativement stable. Pour le rendement correspondant au poids du *Pectoralis major* sur le poids de l'embryon (%), une diminution significative a été observée sur la période E14-J0. Ces résultats indiquent que la croissance du muscle *Pectoralis major* est ralentie en fin de développement embryonnaire puis stimulée en post-éclosion. Avec l'activation de voies associées au dépôt de protéines musculaires, l'alimentation exogène constitue un facteur clé pour maîtriser le rendement en muscle chez les poulets de chair (Lei et al., 2022).

A E12, E14 et E18, aucun effet « lignée » n'a été observé pour le poids de l'embryon, le poids du muscle *Pectoralis major* et son rendement. A l'éclosion, le poids corporel et le poids du muscle *Pectoralis major* étaient significativement plus élevés chez les pHu+ que chez les pHu- (+2 g et +60 mg, respectivement). Ces différences pourraient être liées à une teneur plus élevée en acides aminés branchés dans le vitellus (E0), le liquide amniotique (E10) et le liquide allantoïque (E10) des œufs pHu+ (Petit et al., 2022 ; Petit et al., 2023).

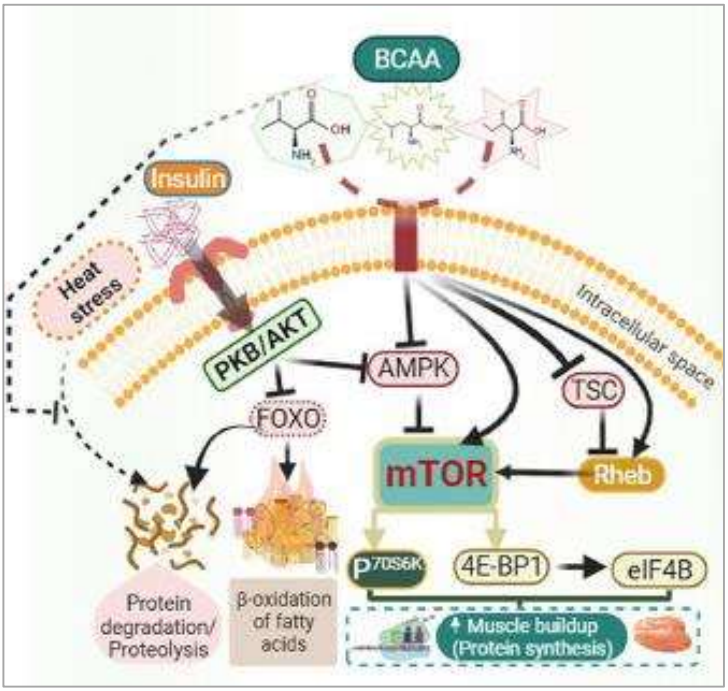


Figure 25 : Régulation de la voie de signalisation mTOR par les acides aminés branchés tels que la leucine, l'isoleucine et la valine (Kim et al., 2022).

Outre leur implication en tant qu'éléments constitutifs de la synthèse des protéines structurelles et contractiles, les acides aminés branchés régulent de nombreuses voies de signalisation et fonctions métaboliques (synthèse des protéines, utilisation du glucose, immunité, élimination des espèces réactives de l'oxygène, biogenèse mitochondriale…) (Mattick et al., 2013 ; Nie et al., 2018 ; Hinkle et al., 2022 ; Kim et al., 2022) (**Fig. 25**).

A J8, le poids corporel était significativement plus élevé chez les pHu- que chez les pHu+ (+5,6 g ; P = 0,035) tandis que le poids du muscle *Pectoralis major* et son rendement n'étaient pas différents entre les deux lignées. Rappelons que cette plus forte croissance des pHu- durant la première semaine de vie est associée à une consommation alimentaire et un gain de poids supérieurs entre le 5ème et le 10ème jour de vie post-éclosion (Berger et al., 2022). A J0 comme à J8, les différences de poids entre les lignées ne sont pas liées au sexe des animaux.

Evolution des gènes d'intérêt au cours du développement pré- et post-éclosion du muscle

Le regroupement hiérarchique des gènes a permis d'identifier 8 clusters distincts chez les pHu- (**Fig. 26**) contre 6 chez les pHu+ et (**Fig. 28**). Les profils d'expression moyens obtenus au cours de la période pré- et post-éclosion sont illustrés dans la **Figure 27** pour les pHu- et la **Figure 29** pour les pHu+.

A E12 et E14, les gènes en lien avec le développement musculaire (*FGF2*, *IGF1*, *IGFR*, *PAX7*, *MYF5*, *MyoG, MyoD1*), l'homéostasie énergétique (*PRKAA1*, *PRKAG2*), le métabolisme protéique (*AKT1*, *mTOR*, *RPS6*, *EIF3F*, *PSMA1*), le métabolisme glucidique (*PHKD*, *PYG*, *SLC2A8*, *SLC5A1*, *G6PC2*), le métabolisme lipidique (*PPARG*, *HADH*), le transport d'ADP et d'ATP (*ANT3*) et la régulation des hormones thyroïdiennes (*DIO1*, *DIO3*) présentaient un niveau d'expression plus élevé qu'à E18, J0 et J8 (clusters A, B et H chez les pHu- / clusters 3, 4 et 6 chez les pHu+). De forts niveaux d'expression ont également été observés pour des gènes du cluster D (cluster 5 chez les pHu+) en lien avec la synthèse protéique (*P70S6K*), le métabolisme glucidique (*PRKAB1*, *GSK3*), le métabolisme lipidique (*FASN*, *ACOX1*) et l'autophagie (*UVRAG*, *ATG4B*, *ATG12*).

Dans le dernier tiers du développement embryonnaire (E18), une diminution transitoire de l'expression a été observée pour les gènes en lien avec le développement musculaire (*FoxO1*, *IFRD1*, *MYF5*, *MyoD1*), l'homéostasie énergétique (*PRKAA1*, *PRKAG2*), le métabolisme protéique (*AKT1*, *mTOR*, *EIF3F*, *PSMA1*), le métabolisme du glycogène (*FOSL2*), la β-oxydation (*ACAA2*, *HADH*, *CPT1A*), l'activité mitochondriale (*ANT3*, *CS*), l'autophagie

(*ULK1*) et la protection antioxydante (*CAT*). Chez les pHu-, ces gènes font partie intégrante des clusters A, E et H qui correspondent respectivement aux clusters 6, 1 et 4 chez les pHu+. Une diminution de l'expression a également été observée pour l'ensemble des gènes du clusters D (*SLC2A1*, *SCD*, *SREBP1*, *DIO2* + ceux énoncés à la fin du paragraphe précédent).

Des niveaux d'expression relativement faibles ont été observés à l'éclosion pour les gènes du cluster D et une partie des gènes du cluster A (*IGF1*, *PAX7*, *MyoG*, *PHKD*). A l'inverse, un pic d'expression précédé d'une augmentation à E18 a été noté pour les gènes *TRIM63*, *FBXO32*, *ACAA2*, *CD36*, *PGC1A* et *COX4I1* en lien avec la protéolyse musculaire, la β-oxydation et le transport des acides gras ainsi que l'activité mitochondriale (biogenèse et phosphorylation oxydative).

Au 8ème jour de vie, un très fort niveau d'expression a été noté pour les gènes *MYH1E*, *MYH1F*, *IGF2*, *IFRD1* (développement musculaire), *PRKAA2*, *PRKAB1*, *PRKAB2*, *PRKAG1*, *PRKAG3* (homéostasie énergétique), *P70S6K*, *RPTOR*, *CTSB* (métabolisme protéique), *PHKA1*, *PHKB*, *PHKG1*, *GSK3*, *GYS1*, *FOSL2*, *PPP1R3A*, *ENO3*, *SLC2A1*, *SLC2A12* (métabolisme glucidique), *SREBP1*, *SCD*, *ACOX1* (métabolisme lipidique), *CS* (cycle de Krebs), *ULK1*, *UVRAG*, *ATG12*, *SQSTM1* (autophagie), *SOD2*, *CAT* (défense antioxydante) et *DIO2* (régulation des hormones thyroïdiennes). Ces gènes sont regroupés dans les clusters C, D et E chez les pHu- correspondant aux clusters 1 et 5 chez les pHu+.

La période embryonnaire est une période critique durant laquelle l'expression des gènes liés au développement musculaire est la plus active (Liu et al., 2020). D'après Ren et al. (2021), l'expression des gènes liés au développement musculaire diminue au fur et à mesure que le muscle gagne en maturité. A l'approche de l'éclosion, la croissance du muscle *Pectoralis major* est ralentie avec un poids moyen de 433 mg à E18 et J0. D'un point de vue physiologique, le ralentissement de la croissance musculaire se traduit par une diminution des niveaux d'expression de plusieurs voies et fonctions métaboliques mais aussi par une augmentation du niveau d'expression des gènes *TRIM63* (multiplié par 2) et *FBXO32* (multiplié par 7), plus connus sous le nom de *MurF-1* et *Atrogine-1*. A l'approche de l'éclosion, la néoglucogenèse issue du catabolisme des protéines devient le mécanisme prépondérant pour fournir du glucose (Kornasio et al., 2011 ; Dang et al., 2022), limitant ainsi la croissance du muscle (Uni et al., 2005).

Le pic d'expression observé à J0 pour les gènes *CD36*, *ACAA2*, *COX4I1* et *PGC1A* souligne l'importance du transport des acides gras et de la phosphorylation oxydative dans la production d'énergie et celle du coactivateur transcriptionnel PGC1A dans la biogenèse mitochondriale, la défense antioxydante et la résistance à l'atrophie pour limiter son importance au moment de l'éclosion (Chen et al., 2013 ; Washington et al., 2022).

Les facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGFs) ont un rôle clé dans le développement embryonnaire et la croissance post-éclosion des muscles squelettiques (Dupont et Holzenberger, 2003). Leur synthèse et leur production sont tissu et âge-dépendant. Dans notre étude, l'expression d'*IGF2* a augmenté de manière continue entre E14 et J8 tandis que l'expression d'*IGF1* a diminué entre E12 et J0 puis augmenté entre J0 et J8. Ces résultats confirment que le statut nutritionnel est un important régulateur d'*IGF1* et qu'il existe probablement un effet compensatoire entre *IGF1* et *IGF2* au cours du développement de l'embryon (Liu et al., 2016). A E12 et E14, le niveau d'expression d'*IGF1* était plus élevé que celui d'*IGF2*, ce qui suggère un rôle plus important de ce gène dans la croissance musculaire lors des phases précoces du développement. IGF1 est un facteur de croissance autocrine/endocrine qui a un large éventail d'effets, notamment sur l'anabolisme (absorption du glucose et des acides aminés, synthèse des protéines…), la prolifération des cellules satellites, la croissance et la différenciation cellulaire (McMurtry et al., 1997). Peu d'études ont été réalisées sur le rôle d'IGF2 chez les espèces aviaires.

A 8 jours d'âge, les poussins ont accès à l'eau et la nourriture *ad libitum* ce qui permet un fort développement du muscle *Pectoralis major* et l'activation de la voie p70S6K impliquée dans la régulation de la synthèse protéique (Bigot et al., 2003). Ils interagissent également avec leurs congénères ce qui implique une activité physique et une sollicitation plus importante du muscle *Pectoralis major*. Pour répondre à la demande accrue en énergie et aux processus cellulaires adaptatifs, plusieurs cascades de signalisation, en lien avec les messagers cytosoliques (calcium, AMP, créatine…), sont activées. L'AMPK, connue pour son rôle essentiel dans l'homéostasie énergétique, est fortement impliquée dans ces processus de régulation. Dans la présente étude, l'expression des sous-unités α2, β2 et γ3 de l'AMPK (formes majoritaires dans le muscle) a été multiplié par 5 voire 6 durant la première semaine post-éclosion. Chez l'homme, seul l'hétérotrimère α2/β2/γ3 est phosphorylé et activé lors d'un exercice de plus ou moins forte intensité (30s, 120s et 20 min, Birk et Wojtaszewski, 2006). L'activation de l'AMPK par phosphorylation de la thréonine 172 entraine une augmentation rapide de l'absorption et de la mobilisation intracellulaire du glucose et des acides gras. Elle favorise

également le transfert du coactivateur transcriptionnel PGC1A vers le noyau, où il contribue à la biogenèse mitochondriale et à la transcription de gènes en lien avec le métabolisme énergétique (Tiraby et Langin, 2005 ; Jørgensen et al., 2006 ; Spaulding et Yan, 2022). L'AMPK est également un régulateur positif de l'autophagie dans les cellules musculaires squelettiques (inhibition de mTOR et interaction direct avec ULK1). Ce processus est médié par les ATGs qui contrôlent la formation des autophagosomes. Dans la présente étude, les gènes *ATG4B* et *ATG12* sont positivement corrélés à la sous-unité catalytique α2, forme majoritaire dans le muscle (r^2 = 0,32 et 0,47, respectivement). D'après Jørgensen et al. (2006), le glycogène musculaire est un facteur important dans la régulation de l'AMPK dont les sous-unités régulatrices β contiennent un domaine de liaison au glycogène, hautement conservé entre les espèces. Le glycogène est une ressource énergétique importante pour maintenir la croissance corporelle pendant les périodes pré- et post-éclosion des oiseaux (Moran, 2007). Chez les lignées pHu+ et pHu-, une forte augmentation de l'expression a été observée entre J0 et J8 pour *GYS1*, *PPP1R3A*, *SLC2A1* et *SLC2A12*. Ces résultats montrent que le transport du glucose dans les cellules musculaires et la synthèse de glycogène sont stimulés par les apports exogènes de nutriments. Selon Dang et al. (2022), l'augmentation des teneurs en glycogène après l'éclosion est aussi le reflet de l'augmentation de la taille des fibres musculaires. Pour terminer, nous avons noté une augmentation de l'expression d'enzymes impliquées dans la β-oxydation des acides gras (*ACAA2*, *CPT1A*) entre E18 et J0 suivie d'une diminution à J8, lorsque la croissance musculaire s'accentue.

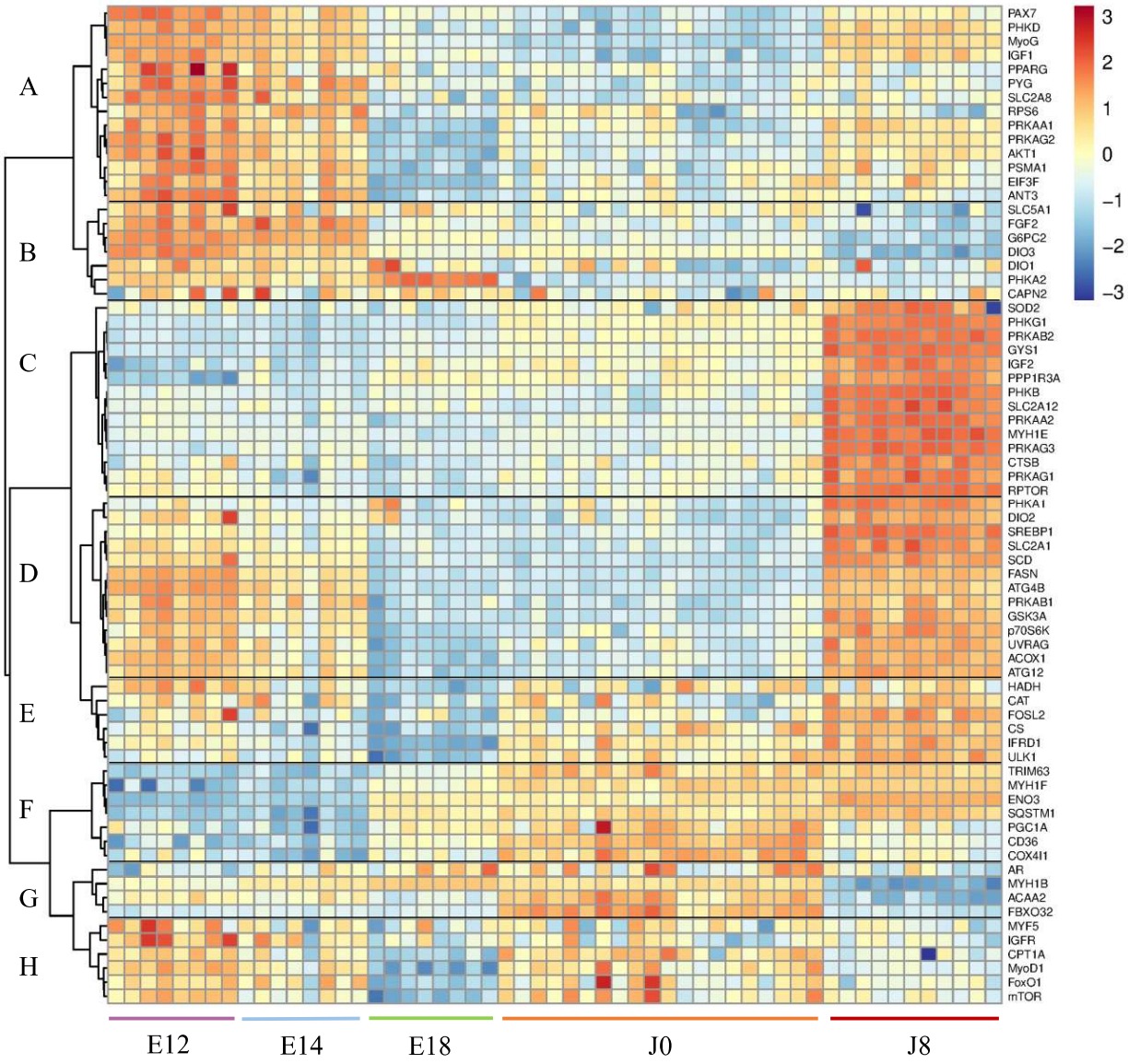


Figure 26 : Evolution de l'expression des gènes d'intérêt, mesurée dans le muscle *Pectoralis major* des pHu-, au cours du développement embryonnaire (E12, E14, E18) et post-éclosion (J0 et J8).

Les lettres situées à gauche de la heatmap correspondent aux différents clusters. En orange et rouge, les gènes sur-exprimés et en bleu, les gènes sous-exprimés par rapport à la moyenne de la distribution correspondant au point 0 sur l'échelle des couleurs.

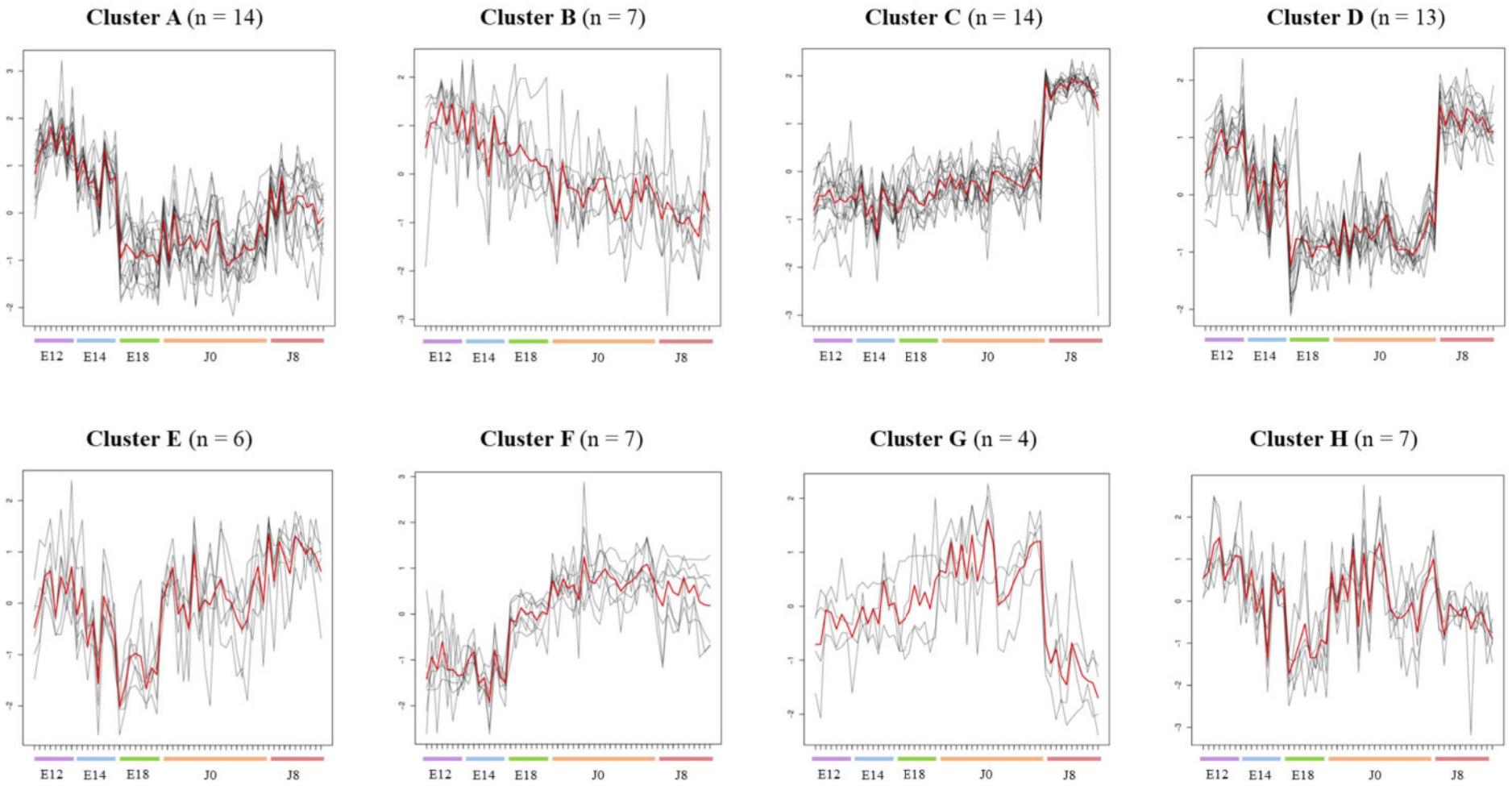


Figure 27 : Représentation des 8 clusters identifiés chez les pHu- entre E12 et J8.

La ligne rouge représente le profil d'expression moyen et les lignes en noir représentent les gènes identifiés pour chaque cluster. Les tirets sur l'axe des abscisses correspondent aux échantillons.

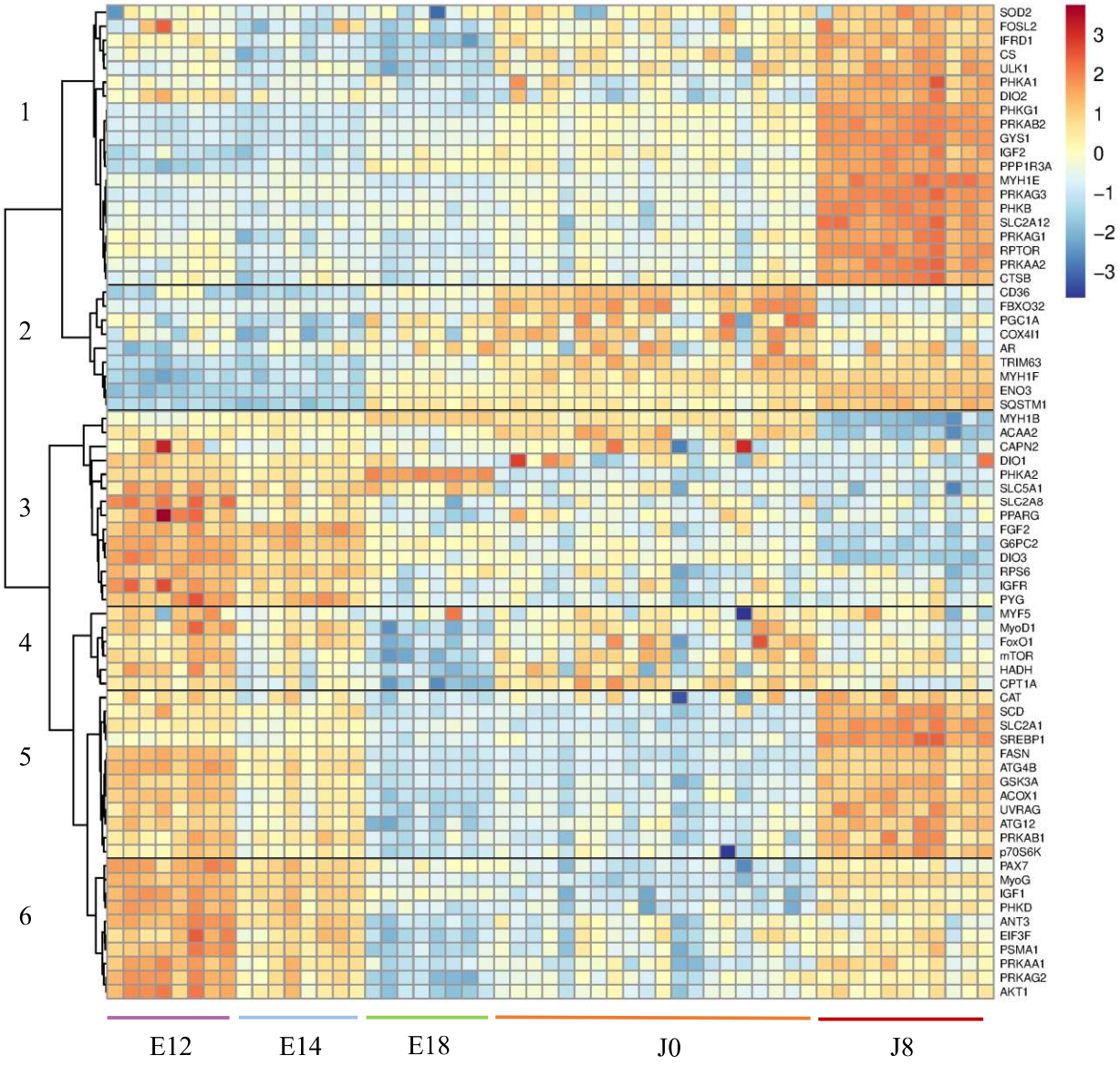


Figure 28 : Evolution de l'expression des gènes d'intérêt, mesurée dans le muscle *Pectoralis major* des pHu+, au cours du développement embryonnaire (E12, E14, E18) et post-éclosion (J0 et J8).

Les chiffres situés à gauche de la heatmap correspondent aux différents clusters. En orange et rouge, les gènes sur-exprimés et en bleu, les gènes sous-exprimés par rapport à la moyenne de la distribution correspondant au point 0 sur l'échelle des couleurs.

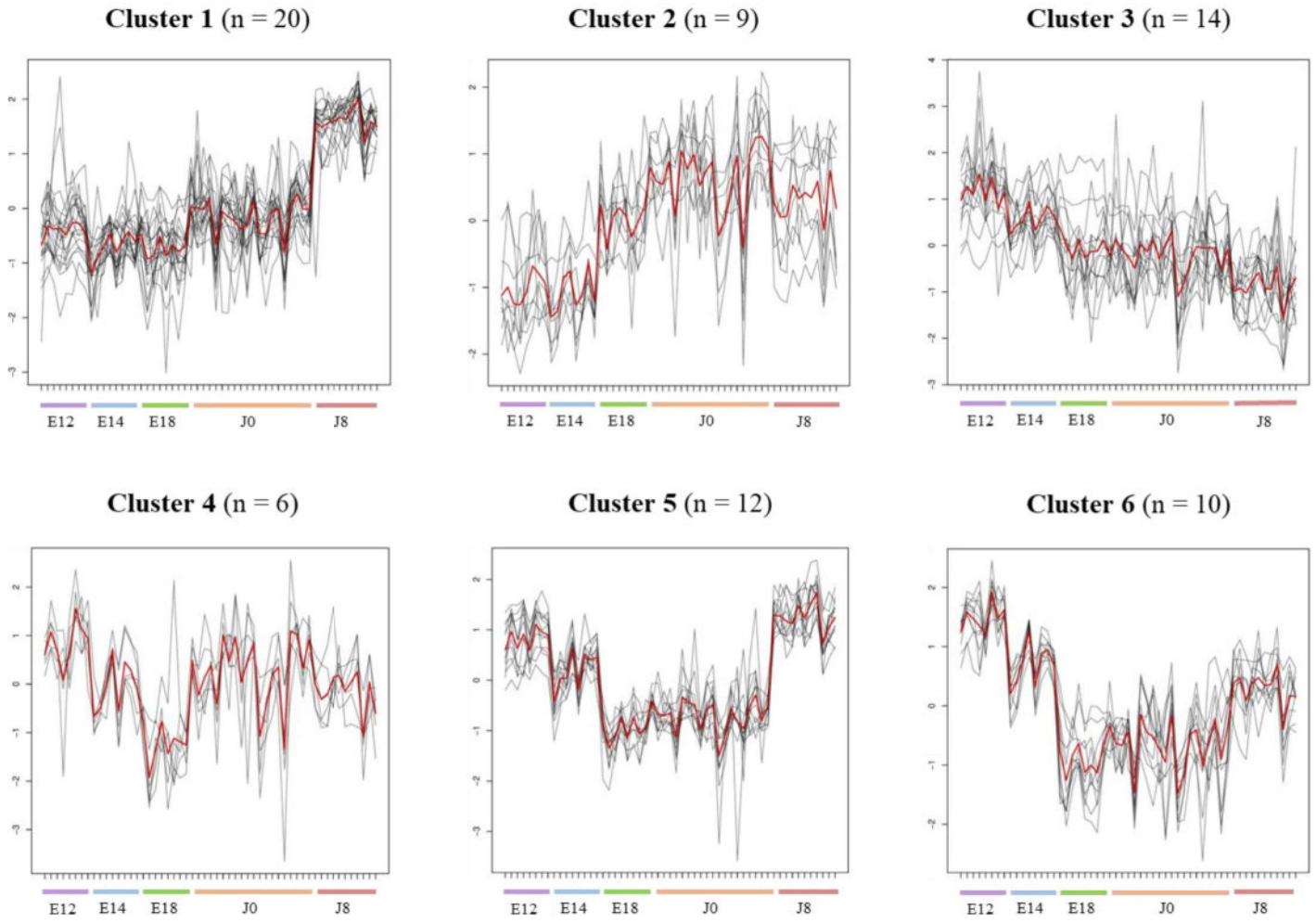


Figure 29 : Représentation des 6 clusters identifiés chez les pHu+ entre E12 et J8.

La ligne rouge représente le profil d'expression moyen et les lignes en noir représentent les gènes identifiés pour chaque cluster. Les tirets sur l'axe des abscisses correspondent aux échantillons.

Tableau 3 : Liste des gènes différentiellement exprimés entre les lignées pHu+ et pHu- durant le développement pré- et post-éclosion (E12 à J8).

Stades	Gènes	pHu+	pHu-	P =
E12	*ACAA2*	4.10 ± 0.28	3.40 ± 0.18	**0.05**
	SOD2	1.10 ± 0.15	1.57 ± 0.14	**0.04**
	DIO3	10.16 ± 0.84	7.64 ± 0.56	**0.03**
E14	*PPP1R3A*	0.77 ± 0.04	1.01 ± 0.08	**0.02**
	SLC2A8	2.52 ± 0.11	3.08 ± 0.21	**0.03**
	SOD2	0.78 ± 0.05	1.25 ± 0.09	**0.0004**
E18	*CAPN2*	2.12 ± 0.14	2.59 ± 0.14	**0.04**
	PRKAA1	1.66 ± 0.07	1.43 ± 0.06	**0.02**
	PPP1R3A	1.42 ± 0.06	1.64 ± 0.07	**0.02**
	G6PC2	2.38 ± 0.09	1.93 ± 0.09	**0.002**
	ACAA2	2.61 ± 0.15	2.13 ± 0.12	**0.02**
	SOD2	0.90 ± 0.17	1.29 ± 0.13	0.09
J0	*CAPN2*	2.70 ± 0.34	2.06 ± 0.13	0.08
	FOSL2	2.95 ± 0.24	2.23 ± 0.19	**0.02**
	PPP1R3A	1.18 ± 0.06	1.56 ± 0.08	**0.0004**
	G6PC2	1.56 ± 0.09	1.34 ± 0.08	0.09
	SQSTM1	1.97 ± 0.09	2.33 ± 0.12	**0.02**
J8	*IGF1*	2.22 ± 0.16	3.17 ± 0.25	**0.005**
	MYF5	2.49 ± 0.20	2.03 ± 0.08	**0.04**
	IFRD1	4.34 ± 0.13	3.81 ± 0.15	**0.01**
	AR	3.54 ± 0.35	2.75 ± 0.16	**0.05**
	CTSB	4.48 ± 0.18	3.65 ± 0.16	**0.003**
	PRKAB2	5.28 ± 0.22	6.24 ± 0.30	**0.02**
	PRKAG2	2.60 ± 0.05	2.76 ± 0.06	0.06
	PHKG1	4.53 ± 0.09	4.23 ± 0.10	**0.03**
	PHKD	2.43 ± 0.05	2.61 ± 0.04	**0.02**
	PPP1R3A	3.39 ± 0.09	3.75 ± 0.08	**0.007**
	SLC2A8	1.85 ± 0.12	2.20 ± 0.12	0.06
	CD36	1.31 ± 0.11	1.60 ± 0.08	**0.05**
	CPT1A	1.63 ± 0.10	1.33 ± 0.10	**0.05**
	CS	4.16 ± 0.25	3.64 ± 0.10	0.07
	SQSTM1	3.34 ± 0.15	2.86 ± 0.08	**0.009**

Les données représentant des moyennes ± S.E.M. ont été analysées par un test de Student. Les valeurs en gras indiquent les différences significatives ($P \leq 0,05$). La valeur seuil pour les tendances est $P < 0,10$. N = 8 pools de 3 animaux à E12 et E14, N = 8 pools de 2 animaux à E18, N = 20 à J0 et N = 11 à J8. Ces effectifs sont valables pour les deux lignées.

Impact de la sélection sur l'expression des gènes impliqués dans le développement et le métabolisme musculaire

Entre E12 et J0, seulement 10 gènes sur 71 étaient différentiellement exprimés entre les deux lignées (**Tableau 3**). Tous âges confondus, les gènes *ACAA2*, *PRKAA1*, *FOSL2*, *G6PC2* et *DIO3* étaient surexprimés chez les pHu+ tandis que les gènes *CAPN2*, *PPP1R3A*, *SLC2A8*, *SOD2* et *SQSTM1* étaient surexprimés chez les pHu-. A J8, sous l'effet des apports exogènes en nutriments, le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les lignées pHu+ et pHu- a augmenté (N = 12 + 3 en tendance). Les gènes *MYF5*, *IFRD1*, *AR*, *CTSB*, *PHKG1*, *CPT1A*, *CS* et *SQSTM1* étaient surexprimés chez les pHu+ tandis que les gènes *IGF1*, *PRKAB2*, *PRKAG2*, *PHKD*, *PPP1R3A*, *SLC2A8* et *CD36* étaient surexprimés chez les pHu-. Parmi ceux énoncés, seule l'expression du gène *PPP1R3A* était discriminante entre les deux lignées sur presque l'intégralité de la cinétique (E14 à J8). *PPP1R3A* code une sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 1 (PP1) et se lie au glycogène musculaire avec une grande affinité, augmentant ainsi la déphosphorylation de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase. Ce résultat suggère que les pHu- stockent plus de glycogène musculaire que les pHu+ durant la seconde moitié du développement embryonnaire. A J8, la majorité des gènes différentiellement exprimés entre les pHu+ et pHu- sont impliqués dans la croissance musculaire et les processus cataboliques.

D'après le ratio MyoD/MYF5, les cellules musculaires de la lignée pHu- semblent avoir une meilleure capacité à s'engager dans la différenciation après une phase de ralentissement de la croissance musculaire, vers E18, où davantage de cellules sont engagées dans la prolifération (**Fig. 30**). A J8, la différence de ratio est principalement liée à une plus forte expression de *MYF5* chez les pHu+ qui présentent une croissance ralentie par rapport aux pHu- lors de la première semaine de vie (Berger et al., 2022 ; Petit et al., 2023 article foie) et une expression plus faible d'*IGF1* à J8. IFRD1 est une protéine qui peut fonctionner comme un coactivateur ou corépresseur transcriptionnel de la croissance et différenciation des cellules au cours du développement embryonnaire et de la régénération des tissus. Chez les pHu+, la plus forte expression d'*IFRD1* pourrait donc contribuer à un taux de croissance plus faible chez cette lignée. Lors de la croissance des muscles squelettiques, des taux de prolifération plus élevés contribuent à la formation d'un plus grand nombre de fibres musculaires et, post-éclosion, à l'accumulation d'un plus grand nombre de noyaux dans les myofibres.

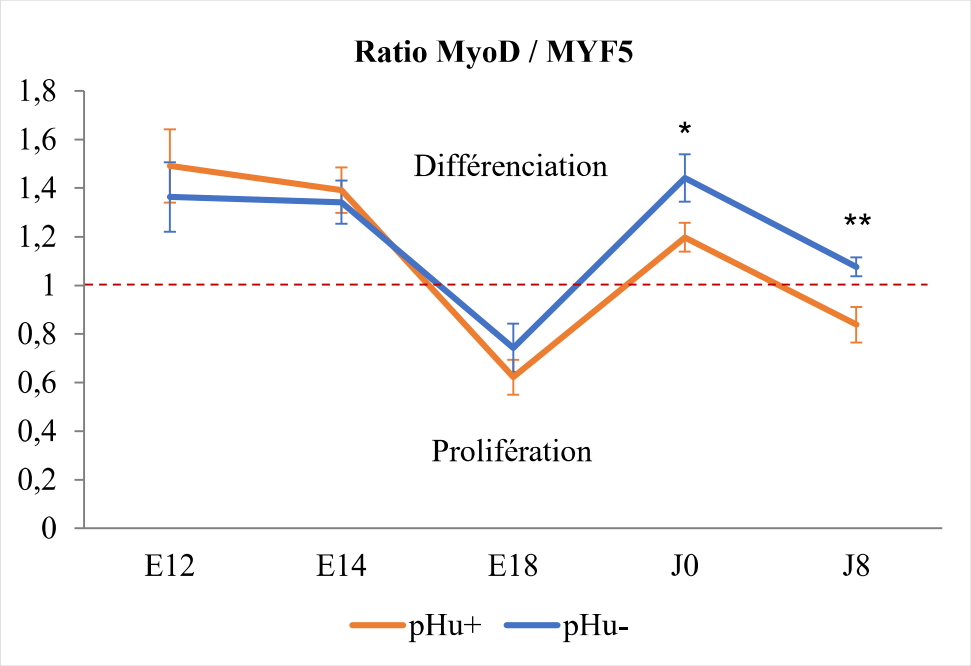


Figure 30 : Mesure du ratio MyoD/MYF5 permettant d'évaluer la capacité des cellules musculaires à proliférer ou s'engager dans la différenciation selon le stade de développement.

Les valeurs inférieures à 1 reflètent une activité proliférative plus importante tandis que les valeurs supérieures à 1 indiquent un processus de différenciation plus accentué. Les étoiles représentent les différences significatives.

Une étude plus approfondie serait donc nécessaire pour déterminer si le taux de prolifération observé à E18 est lié à une formation plus importante de fibres musculaires (pic d'expression pour le gène *MYH1B*), à l'installation finale des cellules satellites dans le muscle ou à des apports énergétiques insuffisants.

Métabolisme musculaire chez les mâles et les femelles

En comparaison au foie, un nombre important de gènes différentiels entre les mâles et les femelles a été rapporté dans le muscle, au moment de l'éclosion (**Tableau 4**). Lors de cette étape critique du développement, les gènes impliqués dans le métabolisme protéique (*AKT1*, *mTOR*, *RPS6*, *FBXO32*), glucidique (*PHKA1*, *PRKAA1*, *PRKAG2*, *GSK3*), lipidique (*PPARG*, *SREBP1*, *ACAA2*, *CPT1A*), l'autophagie (*UVRAG*, *ATG4B*, *ATG12*, *SQSTM1*), la protection antioxydante (*CAT*), la croissance et différenciation cellulaire (*IGF2*, *IGFR*, *IFRD1*) mais aussi dans l'activation des hormones thyroïdiennes (*DIO1*, *DIO2*) étaient significativement plus exprimés chez les mâles que les femelles. Parmi les gènes mentionnés, 4 sont localisés sur le chromosome sexuel Z (*RPS6*, *PRKAA1*, *ACAA2* et *ATG12)* présent en deux exemplaires chez les mâles (homogamétiques ZZ) et un seul chez les femelles (hétérogamétiques ZW). En comparaison, les gènes autosomiques *PRKAG3*, *ENO3*, *SLC2A12* (métabolisme glucidique) et *MYH1F* (myosine néonatale) étaient plus exprimés chez les femelles. A 8 jours d'âge, seulement 6 gènes étaient différentiellement exprimés entre les deux sexes. *FGF2*, *PAX7*, *MYF5*, *RPS6*, *PRKAA1* étaient plus exprimés chez les mâles tandis que *MYH1F* était plus exprimé chez les femelles (données non montrées).

Les hormones sont en grande partie responsables de la communication intégrée des systèmes physiologiques chargés de moduler la croissance et le développement cellulaires (Kraemer et al., 2020). Le nombre et la taille des fibres musculaires sont principalement sous le contrôle de la testostérone. Bien que les femelles synthétisent des androgènes, les concentrations circulantes sont réduites, ce qui contribue à une masse musculaire plus faible (Rossetti et al., 2017). En 2004, Scheuermann et ses collaborateurs ont observé un nombre plus élevé de fibres musculaires chez les mâles. En accord avec une étude menée par Henry et Burke (1998), nos résultats semblent toutefois indiquer une différenciation plus précoce des cellules musculaires chez les femelles. Il est possible que ce phénomène soit lié à une atrophie musculaire plus accentuée chez les mâles qui semblent avoir un métabolisme plus actif et des besoins énergétiques plus élevés au moment de l'éclosion.

Tableau 4 : Liste des gènes différentiellement exprimés entre les mâles et les femelles pHu à l'éclosion.

Voie métabolique	Gène	Mâle	Femelle	P =
Métabolisme protéique	*AKT1*	2.30 ± 0.06	1.99 ± 0.05	**0.0005**
	mTOR	4.42 ± 0.34	3.41 ± 0.22	**0.02**
	RPS6	2.34 ± 0.08	1.64 ± 0.05	**< 0.0001**
	TRIM63	3.94 ± 0.27	3.19 ± 0.30	0.07
	FBXO32	8.27 ± 0.84	5.38 ± 0.85	**0.02**
Métabolisme glucidique	*PHKA1*	1.78 ± 0.35	0.90 ± 0.11	**0.03**
	PRKAA1	2.34 ± 0.10	1.51 ± 0.04	**< 0.0001**
	PRKAG2	2.11 ± 0.06	1.89 ± 0.08	**0.03**
	PRKAG3	0.21 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.08
	GSK3	2.00 ± 0.06	1.80 ± 0.08	**0.05**
	ENO3	0.35 ± 0.03	0.47 ± 0.03	**0.006**
	SLC2A12	1.16 ± 0.05	1.32 ± 0.07	0.06
	FoxO1	2.93 ± 0.22	2.38 ± 0.17	0.06
Métabolisme lipidique	*PPARG*	2.34 ± 0.16	1.83 ± 0.14	**0.02**
	SREBP1	0.98 ± 0.04	0.78 ± 0.05	**0.004**
	ACAA2	5.99 ± 0.20	4.24 ± 0.20	**< 0.0001**
	CPT1A	2.48 ± 0.11	2.01 ± 0.09	**0.003**
Autophagie	*UVRAG*	1.94 ± 0.08	1.63 ± 0.06	**0.003**
	ATG4B	1.31 ± 0.05	1.14 ± 0.04	**0.01**
	ATG12	1.98 ± 0.12	1.60 ± 0.09	**0.02**
	SQSTM1	2.32 ± 0.11	1.94 ± 0.09	**0.01**
Système antioxydant	*CAT*	2.89 ± 0.15	2.21 ± 0.11	**0.002**
Croissance et différenciation	*IGF2*	1.91 ± 0.09	1.57 ± 0.08	**0.008**
	IGFR	2.03 ± 0.16	1.56 ± 0.09	**0.02**
	IFRD1	2.86 ± 0.12	2.42 ± 0.09	**0.007**
	MYH1F	0.64 ± 0.06	0.83 ± 0.05	**0.03**
Régulation des hormones thyroïdiennes	*DIO1*	3.08 ± 0.66	1.23 ± 0.21	**0.02**
	DIO2	1.80 ± 0.29	1.08 ± 0.14	**0.04**

Les données représentant des moyennes ± S.E.M. ont été analysées par un test de Student. Les valeurs en gras indiquent les différences significatives (P ≤ 0 ,05). La valeur seuil pour les tendances est P < 0,10. N = 9 femelles et 11 mâles pour chaque lignée.

III. Approches complémentaires (muscle)

Chez les lignées pHu+ et pHu-, les différences observées dans le muscle à l'âge d'abattage sont déjà présentes à l'éclosion (Métayer-Coustard et al., 2021). La plus faible capacité des poussins pHu+ à stocker les glucides sous forme de glycogène a été associée à une expression plus importante des gènes *SLC2A1* et *SLC2A3*, codant les transporteurs GLUT1 et GLUT3, et d'enzymes impliquées dans des voies oxydatives et glycolytiques. Dans la précédente étude, les niveaux d'expression obtenus pour les gènes *PPP1R3A* et *FOSL2* confirment que le métabolisme du glycogène est différent entre les deux lignées, dès l'éclosion. PPP1R3A est un candidat fonctionnel et positionnel qui favorise la synthèse de glycogène tandis que FOSL2 est un facteur de transcription négativement corrélé aux teneurs en glycogène musculaire (Le Bihan-Duval et al., 2018 ; Liu et al., 2021). Pour approfondir ces résultats et décrire les mécanismes précoces impliqués dans l'établissement des phénotypes, nous nous sommes appuyées sur un dispositif expérimental déjà existant dans lequel des prélèvements de muscle *Pectoralis major* ont été effectués au 16ème jour du développement embryonnaire (E16, n = 7 pools par lignée), à l'éclosion (n = 14/lignée) et au 5ème jour de vie (J5, n = 10/lignée). Dans un premier temps, nous avons mesuré le potentiel glycolytique (PG) du muscle afin d'évaluer les stocks de glycogène en amont de l'éclosion et après 5 jours d'alimentation. Ensuite, nous nous sommes intéressées à plusieurs acteurs moléculaires en lien avec le métabolisme du glycogène.

MATERIELS ET METHODES

Mesure du potentiel glycolytique

La mesure du glycogène est un protocole adapté de Monin et Sellier (1985). Les échantillons de muscle *Pectoralis major* (100 mg) ont été homogénéisés, pendant 4 min, dans 500 µL de H2O et 500 µL d'acide perchlorique froid (PCA, 1 M) à l'aide du TissueLyser II. Après centrifugation (20 min, 4°C, 4000 rpm), 500 µL de surnageant ont été prélevés pour déterminer la concentration en acide lactique (L-LACTIC ACID, réf 984308, ThermoFisher Scientific). Le volume restant a été remis en suspension avec 50 µL d'hydroxyde de potassium (KOH, 5,4 M) et 1 mL d'une solution contenant de l'acétate de sodium (0,2 M) et de l'amyloglucosidase (2 mg/mL). Les échantillons ont été incubés pendant 3 heures à 38°C sous agitation (1400 rpm). Un volume de 100 µL de PCA froid (3 M). Après 10 min à 4°C, les échantillons ont été centrifugés (15 minutes, 4°C, 4000 rpm). Le surnageant a été récupéré pour la détermination du glucose total (Glucose HK, réf 981779, ThermoFisher Scientific). Le PG a été calculé selon

l'équation suivante : GP = 2 x [glucose libre + glucose-6-phosphate + glucose issu de l'hydrolyse du glycogène] + lactate, et a été exprimé en µmol d'équivalent lactate par gramme de tissu.

Mesure de l'activité de la glycogène phosphorylase

Le dosage de la glycogène phosphorylase a été réalisé à l'aide d'un kit commercial (Glycogen Phosphorylase Assay Kit, ab273271, https://www.abcam.com/products/assay-kits/glycogen-phosphorylase-assay-kit-colorimetric-ab273271.html) basé sur la détection du glucose-1-phosphate (G1P) par une série de réactions enzymatiques générant un produit coloré dont l'absorbance est mesurée à 450 nm. L'activité spécifique a été mesurée grâce à la formule suivante :

$$\text{Activité} = \frac{A*D}{(\Delta t*M)} \text{ (mU/mg)}$$

A = G1P de la courbe standard (nmol)
ΔT = Temps de réaction
D = Facteur de dilution
M = Echantillon utilisé (mg)

Quantification de la glycogène phosphorylase par western blot

Les échantillons de muscle *Pectoralis major* ont été lysés dans 1 mL de tampon de lyse (1X) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete™, réf. 11836145001, Roche). Après 30 min à 4°C, les lysats ont été centrifugés (30 min, 10°C, 1000 g). Le surnageant a été récupéré puis centrifugé (45 min, 10°C, 31 000 g). Après dosage des protéines par la méthode de Bradford, les échantillons (40 µg de protéines) ont été préparés avec du tampon de Laemmli x2 (BIO RAD) et du β-mercaptoéthanol (5%) puis chauffés à 90°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines. Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane de nitrocellulose (TransBlot turbo, 7 min, 25 V). Une fois le transfert terminé, les membranes ont été incubées pendant 1 heure avec un mélange de TBS-Tween (1X) et du lait (5%) pour bloquer les sites non spécifiques. Les anticorps primaires anti-PYGM (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) et anti-vinculine (1:2000, Sigma-Aldrich) ont respectivement été dilués dans de l'albumine de sérum bovin (BSA 5%) et dans un tampon commercial (Intercept® Blocking Buffer, TBS, LI-COR) puis incubés avec la membrane

pendant une nuit à 4°C. Après lavage avec du TBS-tween, les membranes ont été incubées (1h30 à l'obscurité et température ambiante) avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore DyLight 680® anti-souris. Les bandes ont été visualisées par fluorescence infrarouge à l'aide du système d'imagerie Odyssey® (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE) et quantifiées à l'aide du logiciel d'application (version 1.2).

RESULTATS ET DISCUSSION

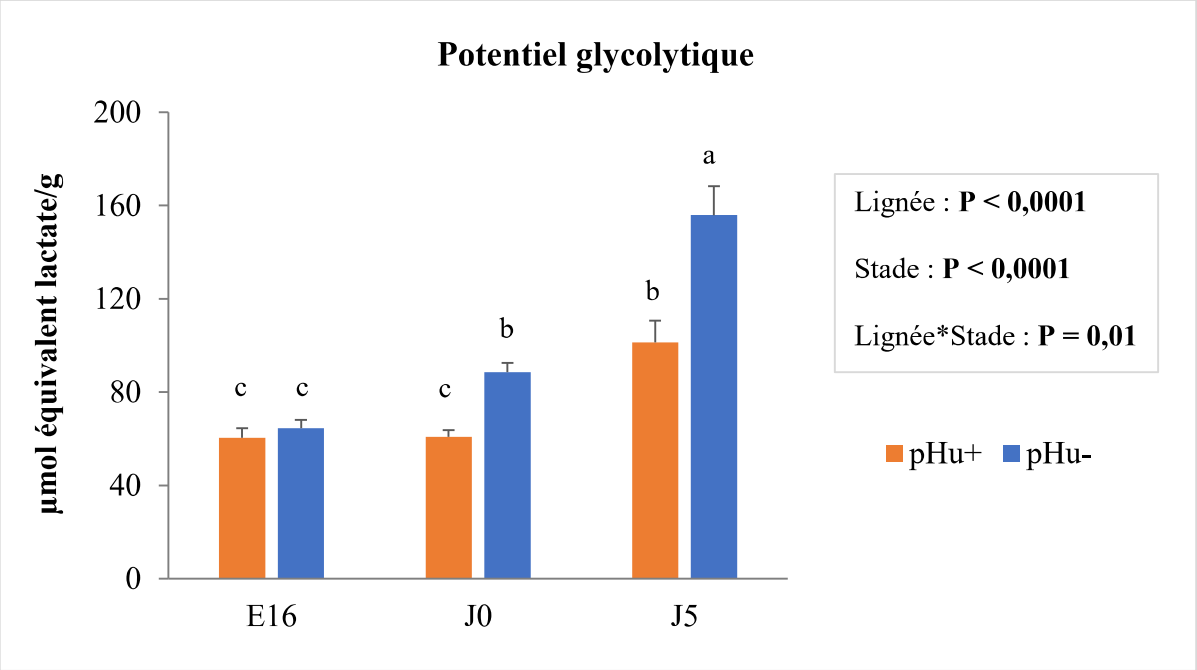
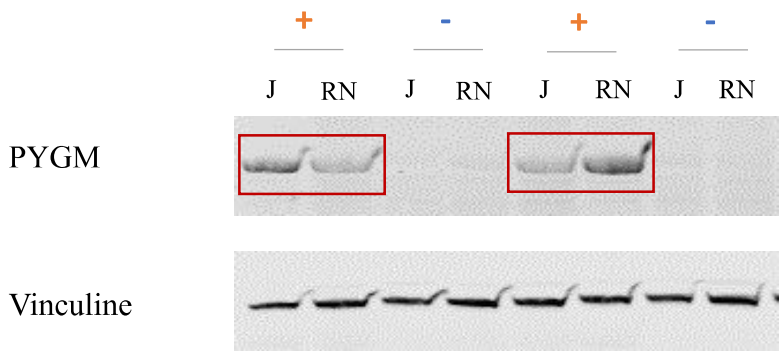


Figure 31 : Evolution du potentiel glycolytique musculaire durant la période pré- et post-éclosion des lignées pHu+ et pHu-.

Les lettres illustrent les différences significatives entre les stades et/ou les lignées ($P \leq 0,05$). Les données ont été analysées par une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test de Tukey.

A l'éclosion et au 5ème jour de vie, le PG était significativement plus élevé dans le muscle *Pectoralis major* des pHu- que celui des pHu+, alors qu'aucune différence n'a été observée chez les embryons à E16 (**Fig. 31**). Une différence de cinétique a également été observée entre les deux lignées. Le potentiel glycolytique a progressivement augmenté entre E16 et J5 chez les pHu- tandis qu'il est resté relativement stable entre E16 et J0 chez les pHu+.

A



B

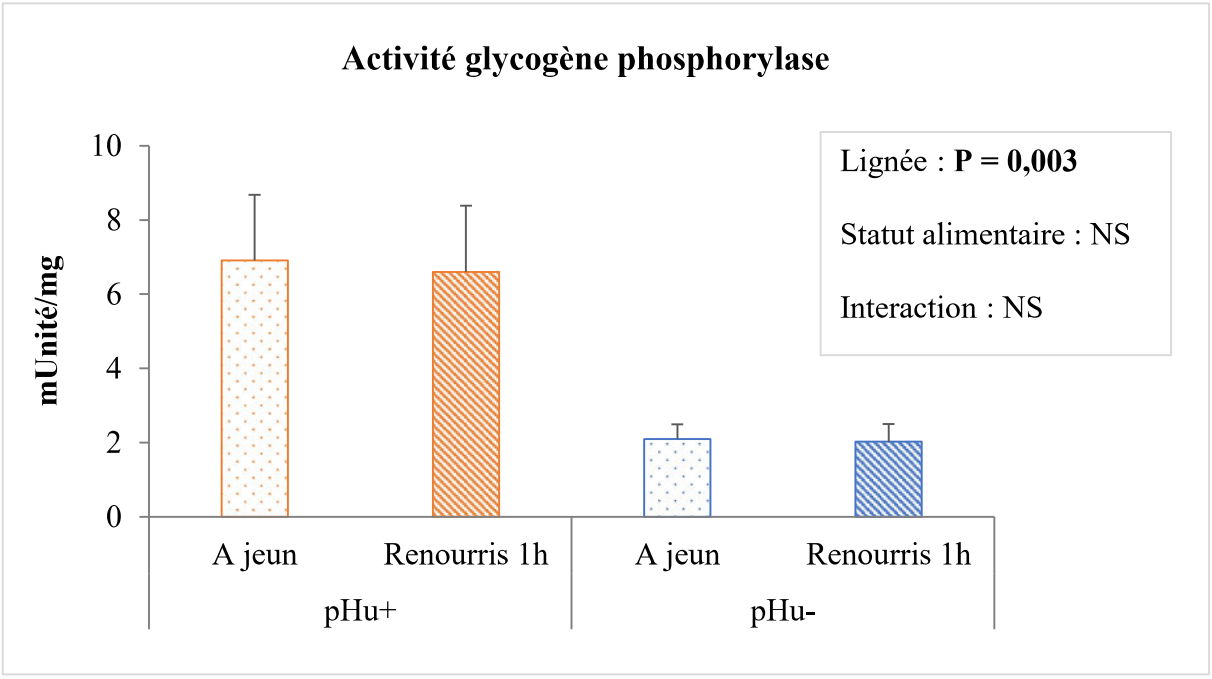


Figure 32 : (**A**) Quantification et (**B**) mesure de l'activité de la glycogène phosphorylase dans le muscle *Pectoralis major* des lignées pHu+ et pHu- à J5, en tenant compte du statut alimentaire des animaux (à jeun *vs* renourris 1 heure).

Contrairement aux pHu+, le PG des pHu- a été multiplié par deux durant les premiers jours de vie avec un delta à J5 proche de celui observé à l'âge d'abattage (Alnahhas et al., 2014). Ces résultats montrent que le différentiel de PG est déjà établi à J5 et suggèrent une moindre capacité des pHu+ à augmenter leur stock de glycogène, probablement en raison d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation du glycogène.

Pour comprendre la différence de stockage du glycogène entre les deux lignées, la glycogène synthase (GS) et la glycogène phosphorylase (PYG), impliquées respectivement dans la synthèse et la dégradation du glycogène, ont été étudiées. Bien que les résultats obtenus pour la GS restent à optimiser, son niveau de phosphorylation semble similaire entre les deux lignées (données non montrées). En revanche, la PYG était plus abondante dans le muscle des poussins pHu+ que dans celui des poussins pHu- (**Fig. 32A**). De plus, l'activité spécifique de la PYG était 3 fois supérieure à celle des pHu- au même âge (**Fig. 32B**).

CONCLUSION

Cette étude a fourni une description détaillée de l'évolution des fonctions et voies métaboliques régissant le métabolisme musculaire. Quelle que soit la lignée, la croissance du muscle connait une forte augmentation entre E12 et E14 puis J0 et J8 avec une période de ralentissement en fin d'incubation. Bien que certains gènes soient différentiellement exprimés dès E12, les différences entre les deux lignées sont majoritairement observées à 8 jours d'âge sous l'influence des apports exogènes de nutriments. Ces différences concernent en grande partie le métabolisme glucidique. D'après l'étude du potentiel glycolytique et des acteurs moléculaires tels que la glycogène synthèse et la glycogène phosphorylase, la plus faible capacité des pHu+ à stocker le glycogène, durant la première semaine de vie, proviendrait d'un déséquilibre en faveur d'un catabolisme du glycogène plus important. Comme mentionné pour le foie, les poussins de la lignée pHu+ sont plus impactés par le processus d'éclosion et ont une demande énergétique plus forte au démarrage, ce qui explique qu'ils soient moins robustes, moins actifs dans la recherche de nourriture et que le taux de mortalité durant la première semaine de vie soit plus élevé que chez les pHu-. Ces résultats font actuellement l'objet d'un quatrième article en cours de rédaction.

Discussion générale

Sélection génétique sur le pH ultime du muscle *Pectoralis major* (pHu+ / pHu-)

Age d'abattage



- Qualité de la viande
- Occurrence des défauts musculaires
- Voies métaboliques activées pour la production d'énergie

Beauclercq et al., 2016 et 2017
Alnahhas et al., 2014 et 2016

Maturité sexuelle



- Performances de reproduction
- Qualité des œufs

Franzoni, 2019
Erensoy et al., 2022

Post-éclosion



- Réserves en glycogène musculaire
- Métabolisme protéino-énergétique
- Qualité des poussins (projet Chick'Tip)

Métayer-Coustard et al., 2021





Sources de nutriments *in ovo*

- Accumulation de métabolites dans le vitellus à E10
- Teneur en lipides du vitellus à E0 : pHu+ > pHu-
- Oxydation des lipides entre E0 et E10 : pHu+ > pHu-
- Abondance en acides aminés ramifiés et glucose dans le liquide amniotique : pHu+ > pHu-
- Absorption des nutriments et teneur en glycogène (membrane du sac vitellin) : pHu+ = pHu-

Orientation métabolique (foie & muscle)

- Ralentissement du métabolisme hépatique et musculaire à E18
- Effet sexe à J0 et J8
- Hétérogénéité plus importante des pHu+ à l'éclosion (foie)
- Différences métaboliques entre les lignées dès E12 pour le foie et principalement à J8 pour le muscle

Liquide allantoïque



- Effet stade très discriminant
- Accumulation de métabolites et augmentation de la variabilité inter-individuelle entre E10 et E17
- Signatures métaboliques propres aux lignées pHu+ et pHu- dès E10
- Abondance plus élevée en substrats énergétiques (glucose et créatine) chez les pHu-
- Abondance plus élevée en formate et dérivés du catabolisme chez les pHu+

Perspectives

- Caractériser la phase liposoluble du vitellus
- Caractériser les embryons à des stades encore plus précoces
- Valider des biomarqueurs du métabolisme des embryons (pHu+ vs pHu-) identifiés dans le liquide allantoïque
- Proposer et tester des stratégies nutritionnelles précoces

Figure 33 : Schéma intégrant les principaux résultats de la thèse et les perspectives.

Pour répondre à nos questions de recherche, nous nous sommes appuyées sur un modèle original de deux lignées divergentes pour le pH ultime de la viande. Après un état de l'art sur les connaissances acquises en amont ou en parallèle de ma thèse, les principaux résultats obtenus pour la caractérisation des compartiments de l'œuf (vitellus, liquide amniotique et liquide allantoïque) ainsi que pour le métabolisme protéino-énergétique des lignées pHu au cours du développement pré- et post-éclosion, ont été réintégrés dans la **Figure 33**.

Les sources nutritives de l'œuf

L'analyse des profils métaboliques a permis d'identifier 31 métabolites dans le vitellus, 30 dans le liquide amniotique et 40 dans le liquide allantoïque. La caractérisation fine de l'environnement nutritionnel des embryons a ensuite révélé des différences de composition, entre les lignées, pour le vitellus et le liquide amniotique. A E0, le pourcentage de lipides ainsi que l'abondance en leucine, histidine, glycine, lactate et hypoxanthine du vitellus étaient plus élevés chez les pHu+. A E10, une abondance plus élevée en acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine), 2-oxoisocaproate, alanine, citrate et glucose a été observée dans le liquide amniotique des pHu+. Le liquide amniotique des pHu- était quant à lui plus riche en glutamine, choline, tyrosine, acétate, créatine, inosine et formate. Parmi les 40 métabolites identifiés dans le liquide allantoïque, 31 étaient communs au vitellus et/ou au liquide amniotique. De même que pour le liquide amniotique à E10, la leucine et l'isoleucine étaient plus abondantes chez les pHu+ tandis que la créatine et la choline étaient plus abondantes chez les pHu-.

Pour tenter d'expliquer la teneur plus élevée en lipides du vitellus chez les pHu+, nous nous sommes intéressées au foie des reproductrices, tissu impliqué dans la synthèse des précurseurs du jaune d'œuf. Bien que ces dernières aient reçu le même régime alimentaire dans notre dispositif expérimental, le métabolisme des lipides semble plus oxydatif chez les pHu+ (surexpression de *CPT1A*) et la synthèse des acides gras plus importante chez les pHu- (surexpression de *SCD*). Ces résultats n'expliquent donc pas la teneur plus élevée de lipides chez les pHu+ et nécessitent des mesures complémentaires sur le transport des lipides et leur captage au niveau des ovocytes.

Les lipides du vitellus sont une source majeure d'énergie pour la croissance des embryons. Au cours du développement, plus de 90% de l'énergie provient de l'oxydation des acides gras (Sato et al., 2006). A E10, la teneur en lipides et la proportion en acide myristoléique (marqueur de l'oxydation des acides gras polyinsaturés) traduisent une utilisation plus importante des substrats lipidiques pour la production d'énergie et le développement des embryons pHu+. Ce

processus métabolique, tout comme la perte de poids des œufs lors du stockage, pourrait être lié à une moindre épaisseur et une fragilité accrue de la coquille chez les pHu+. Comme mentionné par Damaziak et al. (2023), l'épaisseur et la porosité de la coquille sont capables d'affecter les échanges gazeux ainsi que les pertes en eau par évaporation.

Pour compléter la caractérisation de l'environnement nutritionnel des embryons pHu, une approche par spectrométrie de masse est envisagée pour la phase liposoluble du vitellus. Cette dernière contient des composants essentiels au développement embryonnaire tels que les caroténoïdes, les vitamines A, D, E et K, les acides gras et les hormones dérivées du cholestérol dont font partie des hormones stéroïdiennes (Fortuna et al., 2023). Lors de l'étude des caractéristiques internes de l'œuf, nous avons constaté que le vitellus des pHu+ était plus coloré que celui des pHu-. Chez les poulets, la couleur du vitellus varie en fonction de la teneur en caroténoïdes (lutéine, zéaxanthine), pigments liposolubles qui possèdent de multiples fonctions telles que la protection antioxydante, la régulation du système immunitaire, etc. (Saini et al., 2018 ; Nabi et al., 2020). Plusieurs études ont suggéré que les caroténoïdes réduisent le stress oxydatif avant et après l'éclosion par le biais de différents mécanismes, comme la neutralisation des radicaux libres, l'activation d'enzymes antioxydantes ou la régulation de voies de signalisation (Surai et Sparks, 2001 ; Surai et al., 2003 ; Saini et al., 2018). Par ailleurs, des études ciblées conduites dans le cadre du projet Chick'Tip, visant à identifier de nouveaux indicateurs et biomarqueurs de la qualité du poussin, ont montré des teneurs en hormones stéroïdiennes (oestradiol, testostérone, progestérone, androstènedione) significativement plus élevées dans le vitellus des pHu-. D'après Bertin et al. (2016), l'exposition prénatale aux hormones stéroïdiennes peut influencer l'apprentissage chimiosensoriel *in ovo* et le comportement exploratoire des poussins qui s'avèrent être plus actifs pour rechercher la nourriture. D'après cette étude, les teneurs plus élevées en stéroïdes dans les œufs pHu- pourraient expliquer la plus forte consommation journalière d'aliment et le gain moyen quotidien plus élevé chez cette lignée entre le 5ème et le 10ème jour post-éclosion (Berger et al., 2022). Chez les poussins exposés à des niveaux plus élevés d'androgènes, le comportement alimentaire est stimulé ce qui peut favoriser la maturation du tube digestif, la mise en place de la thermorégulation, la prise de poids corporel et une utilisation plus efficace des nutriments exogènes (Pilz et al., 2004 ; Groothuis et al., 2005 ; Navara et Mendonça, 2008).

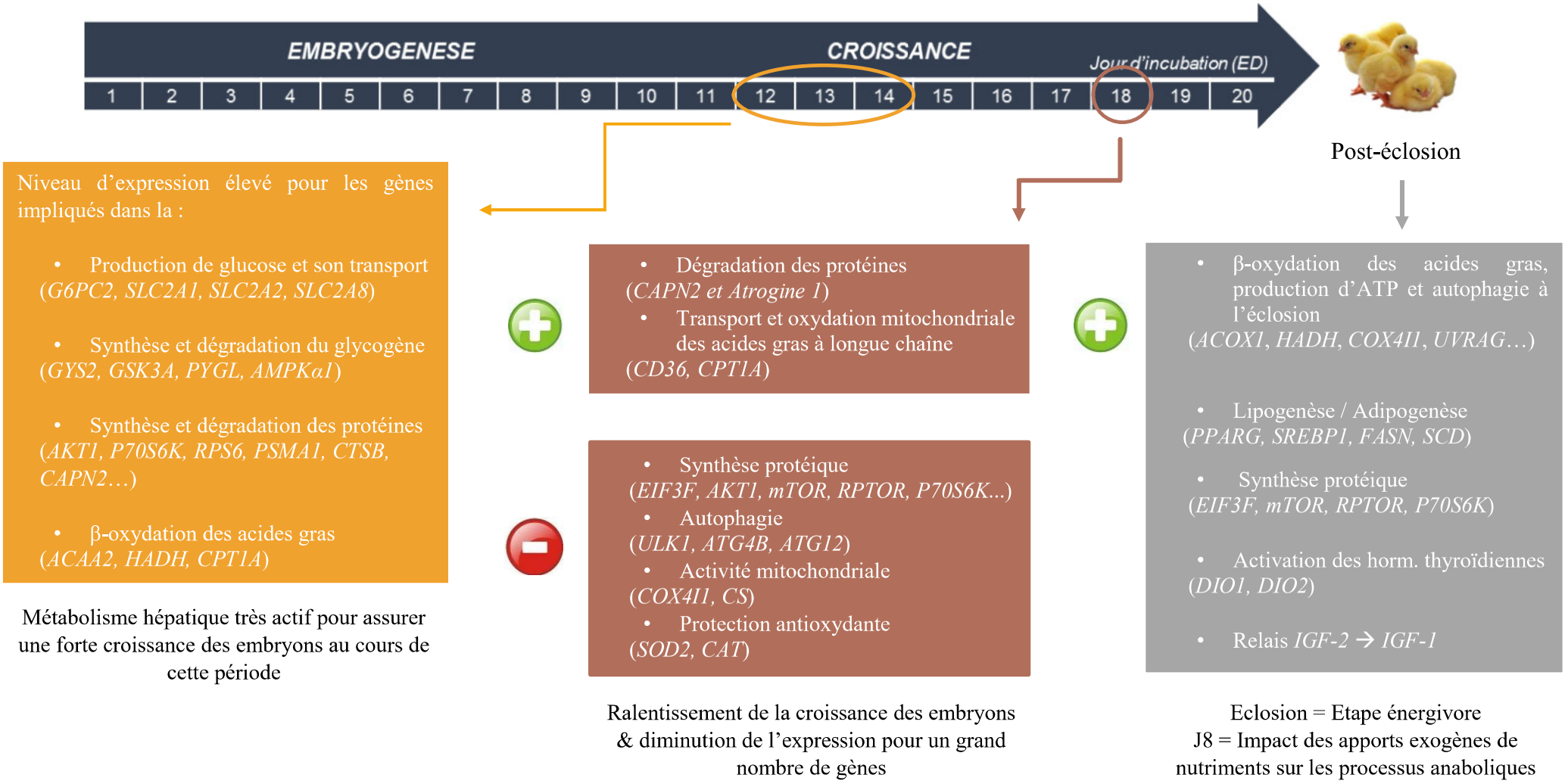


Figure 34 : Illustration des principaux changements métaboliques dans le foie au cours du développement embryonnaire (E12, E14, E18) et post-éclosion (J0, J8) des lignées pHu. + et - : Fonctions et voies métaboliques pour lesquelles l'expression des gènes est respectivement augmentée et diminuée.

Le métabolisme hépatique et musculaire au cours du développement pré- et post-éclosion

Cinétique

Les différentes voies métaboliques étant interconnectées et pour certaines peu documentées chez les jeunes oiseaux, nous avons étudié l'expression d'un large éventail de gènes au niveau du foie et du muscle *Pectoralis major*. Les principaux changements métaboliques observés dans le foie des lignées pHu, au cours du développement pré- et post-éclosion, sont illustrés dans la **Figure 34**.

Notre cinétique présente l'originalité d'inclure un moment clé du développement qu'est l'éclosion tandis que de nombreuses études se focalisent sur la période embryonnaire ou la transition alimentaire périnatale (passage d'une alimentation *in ovo* riche en lipides à un régime post-éclosion riche en glucides). En fin d'incubation, les lipides du sac vitellin ont une contribution insuffisante pour répondre aux besoins énergétiques de l'embryon et les réserves en glycogène diminuent, ce qui oblige l'embryon à dégrader davantage de protéines musculaires pour la néoglucogenèse. Ce phénomène se traduit par un ralentissement de la croissance et du développement jusqu'à ce que le poussin nouvellement éclos accède à la nourriture exogène (Kornasio et al., 2011).

Lignées pHu+ et pHu-

D'après l'étude comparée des lignées, l'orientation métabolique semble établie plus précocement dans le foie (dès E12) que dans le muscle (principalement à partir de J8). A E12 et E14, les gènes impliqués dans la protéolyse, la dégradation du glycogène, la synthèse d'ATP et l'autophagie étaient plus exprimés dans le foie des embryons pHu+. Ces résultats suggèrent une activité métabolique plus intense pour répondre aux besoins énergétiques et assurer la croissance des embryons pHu+. En comparaison, le nombre de gènes surexprimés chez les pHu- à partir de E18 suggère une différence de gestion de l'énergie chez cette lignée à l'approche de l'éclosion. Parmi les voies métaboliques étudiées dans le foie, le métabolisme des glucides semble le plus impacté.

Dans le muscle *Pectoralis major*, l'augmentation de l'expression des gènes *SLC2A1*, *SLC2A12*, *PRKAB2*, *PRKAG3*, *GYS1* et *PPP1R3A* observée à J8 à l'état nourri est en faveur d'une entrée plus importante de glucose à des fins d'utilisation et/ou de stockage sous forme de glycogène selon la lignée.

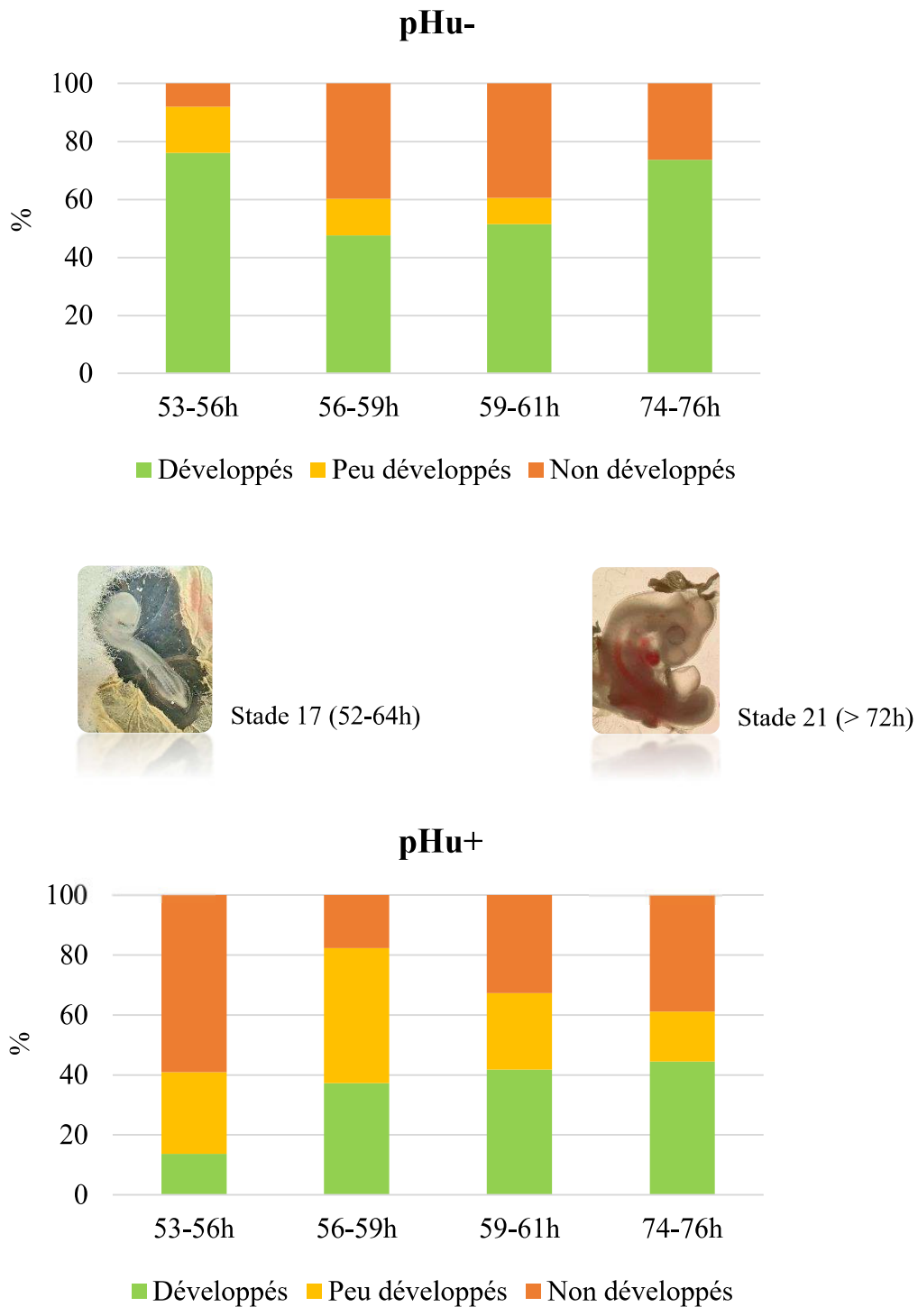


Figure 35 : Répartition du pourcentage d'embryons développés (vert), peu développés (jaune) et non développés (orange) entre 53 et 76 heures d'incubation, chez les lignées pHu+ (N = 146) et pHu- (N = 140).

Les œufs embryonnés sont issus de poules reproductrices âgées de 29 semaines. La caractérisation des embryons a été réalisée par microscopie grâce aux stades décrits dans Hamburger et Hamilton (1951).

Parmi les gènes précédemment cités, *PPP1R3A* a tout particulièrement retenu notre attention. D'après l'identification des régions génomiques potentiellement impactées par la sélection sur le pH ultime de la viande, le gène *PPP1R3A* constitue un candidat fonctionnel et positionnel pouvant expliquer les différences de teneur en glycogène musculaire (Bihan-Duval et al., 2018). Ce gène code une sous-unité régulatrice de la PP1 et se lie au glycogène musculaire avec une grande affinité, augmentant ainsi la déphosphorylation de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase (Savage et al., 2008). Chez la souris, la suppression de *PPP1R3A* entraine une diminution des niveaux de glycogène dans le muscle squelettique avec un facteur 10 (Delibegovic et al., 2003). De manière cohérente, nos résultats ont montré une surexpression de *PPP1R3A* chez les pHu- nourris sur presque l'intégralité de la cinétique (de E14 à J8). Cette surexpression peut expliquer les teneurs plus élevées en glycogène dans le muscle des animaux pHu- à l'éclosion. La faible homologie de séquence entre les mammifères et le poulet rend toutefois difficile l'étude de la protéine PPP1R3A. D'autres stratégies telles que l'invalidation et/ou la surexpression du gène sont envisagées pour valider ce marqueur génétique et son rôle dans le métabolisme du glycogène musculaire. Au vu de l'existence d'isoformes chez les mammifères, nous avons vérifié que *PPP1R3A* est spécifique du tissu musculaire et qu'il s'agit de la seule forme présente dans ce tissu d'intérêt. La distribution de *PPP1R3A* et de ses isoformes a été caractérisée par RT-qPCR sur un large panel de tissus (cœur, cerveau, intestin, muscles squelettiques, etc.).

Des différences de métabolisme ayant été montrées dès E12 entre les deux lignées, il était intéressant de caractériser les embryons pHu+ et pHu- encore plus précocement. Cette caractérisation s'est faite dans le cadre d'un projet en collaboration avec l'Institut Cellule Souche et Cerveau (SBRI) du centre de recherche INSERM (Lyon, France). Selon les premiers résultats, les embryons de la lignée pHu+ présentent, entre 53 et 76 heures d'incubation, un taux de développement plus faible et plus hétérogène que les embryons de la lignée pHu- (**Fig. 35**). Cette disparité dans le développement des embryons pHu+ et pHu- semble persister jusqu'en fin d'incubation avec un gain de poids journalier maximal atteint à E17 chez les pHu- (3,67 g/jour) contre E19 chez les pHu+ (4,13 g/jour) (Franzoni, 2019). Par ailleurs, d'après l'étude des performances de reproduction, le taux de ponte est plus élevé et la production d'œuf plus régulière chez les pHu- (1 œuf par jour contre 1 œuf tous les 2 jours chez les pHu+ environ). Chez le poulet, le développement de l'embryon débute avant la ponte. A basse température, lors du stockage des œufs, le blastoderme cesse son activité métabolique et son développement pour entrer en diapause. Les différences observées lors des premiers stades du développement

suggèrent que les embryons de la lignée pHu+ sont plus hétérogènes et qu'ils ne sont pas tous au même stade que les pHu- lors de la mise en incubation des œufs. La préincubation des œufs (SPIDES) visant à réactiver les mécanismes biologiques pendant le stockage pourrait être une alternative pour synchroniser le développement des embryons, réduire la fenêtre d'éclosion, favoriser l'éclosabilité et améliorer la qualité des poussins (Dymond et al., 2013 ; Pokhrel et al., 2021). La détermination des concentrations en hormones thyroïdiennes (T3 et T4), connues pour leur rôle important dans l'éclosion, la croissance des organes et la production de chaleur (Walter et al., 2010 ; Grommen et al., 2011 ; Rippamonti et Dzialowski, 2023), pourrait révéler d'éventuelles différences dans la maturité des embryons pHu+ et pHu-.

Sexe

Les résultats originaux obtenus pour les mâles et les femelles, au cours de la période post-éclosion, ont confirmé l'importance de considérer le sexe des animaux comme une variable biologique fondamentale. D'après la comparaison des deux tissus, l'effet sexe est particulièrement prononcé dans le muscle *Pectoralis major* au moment de l'éclosion, lorsque les réserves énergétiques sont épuisées. Quel que soit le stade et le tissu, les gènes situés sur le chromosome Z (*RPS6*, *PRKAA1*, *ACAA2* et *ATG12*) étaient plus exprimés chez les mâles que les femelles. La compensation de dose qui permet d'égaliser le niveau d'expression des gènes liés au sexe est moins efficace chez les poulets que chez les mammifères, ce qui explique que ces derniers sont plus exprimés chez les mâles que chez les femelles (Ellegren et al., 2007). Ce déséquilibre contribuerait au dimorphisme sexuel, particulièrement prononcé chez les oiseaux. En 2010, Zhang et ses collaborateurs ont identifié un grand nombre de gènes différentiellement exprimés entre les embryons mâles et femelles dès le stade 4 de Hamburger et Hamilton (1951), c'est-à-dire bien avant qu'une différenciation sexuelle ne se produise. Plusieurs études ont également observé une éclosion plus précoce chez les femelles que chez les mâles (Reis et al., 1997 ; van de Ven et al., 2011). Chez les poulets, le moment de l'éclosion peut avoir des répercussions sur l'absorption du sac vitellin résiduel, l'activité métabolique, le développement du tractus gastro-intestinal, le développement du système immunitaire et la croissance globale (Decuypere et Bruggeman, 2007). Malgré une croissance similaire chez les mâles et les femelles pHu entre J0 et J8, le poids relatif du sac vitellin résiduel était plus élevé chez les mâles au moment de l'éclosion. Ces résultats suggèrent un taux métabolique plus élevé chez les mâles et/ou une plus grande capacité d'absorption des nutriments. Ces hypothèses restent à confirmer par l'étude des transporteurs de nutriments au niveau intestinal.

Stratégies nutritionnelles précoces

Outre la production de connaissances originales et fondamentales sur le dialogue entre l'embryon et son environnement, l'ensemble des résultats obtenus constitue une piste de réflexion pour l'élaboration de stratégies nutritionnelles précoces (alimentation des poussins au démarrage, alimentation des reproducteurs, injections *in ovo*). En volaille, l'ajout de nutriments, de probiotiques ou de prébiotiques dans l'œuf possède plusieurs avantages tels que l'amélioration du démarrage des poussins et de l'efficacité alimentaire, le développement optimal du tractus gastro-intestinal, la diminution de la mortalité et le renforcement de l'immunité (Saeed et al., 2019). Dans notre dispositif expérimental, les injections *in ovo* pourraient être utilisées comme preuve de concept pour s'affranchir de la composante génétique et évaluer les effets à court et moyen terme d'un ou plusieurs nutriments sur le métabolisme des animaux. Ces approches devront être également réalisées sur des lignées commerciales de poulets de chair pour vérifier la généricité des résultats.

D'après les profils d'expression obtenus dans le foie et le muscle *Pectoralis major*, les derniers jours du développement embryonnaire constituent une des fenêtres d'action pour orienter l'activité métabolique, limiter la dégradation des protéines musculaires, favoriser l'éclosion et assurer un meilleur démarrage des poussins. Afin de limiter les risques de mortalité embryonnaire ainsi que la manipulation des animaux après l'éclosion, les composés pourraient être délivrés au 18ème jour d'incubation en même temps que les vaccins. Les réserves en glycogène musculaire n'étant pas différentes entre les lignées à E16, le stade E18 semble également pertinent pour moduler le métabolisme glucidique et notamment les réserves en glycogène, plus importantes chez les pHu- à partir de l'éclosion.

Au-delà de la nutrition *in ovo*, des injections de prébiotiques et/ou de probiotiques ont été développées pour moduler/programmer le microbiote intestinal (stimulation *in ovo*). Ces dernières années, le microbiote intestinal a été reconnu comme affectant profondément le comportement alimentaire, la prise alimentaire et le métabolisme des animaux grâce à sa capacité à communiquer avec d'autres tissus tels que le foie et les muscles squelettiques (Ringseis et al., 2020 ; Giron et al., 2022) (**Fig. 36**). Concernant l'axe intestin-foie, les interactions sont bidirectionnelles (Brandl et al., 2017). Le foie module les fonctions intestinales en produisant des acides biliaires qui jouent un rôle important dans l'absorption des lipides, l'absorption des vitamines liposolubles et dans la défense de l'intestin contre les agents pathogènes. En contrepartie, le foie est le premier destinataire des produits dérivés de l'intestin

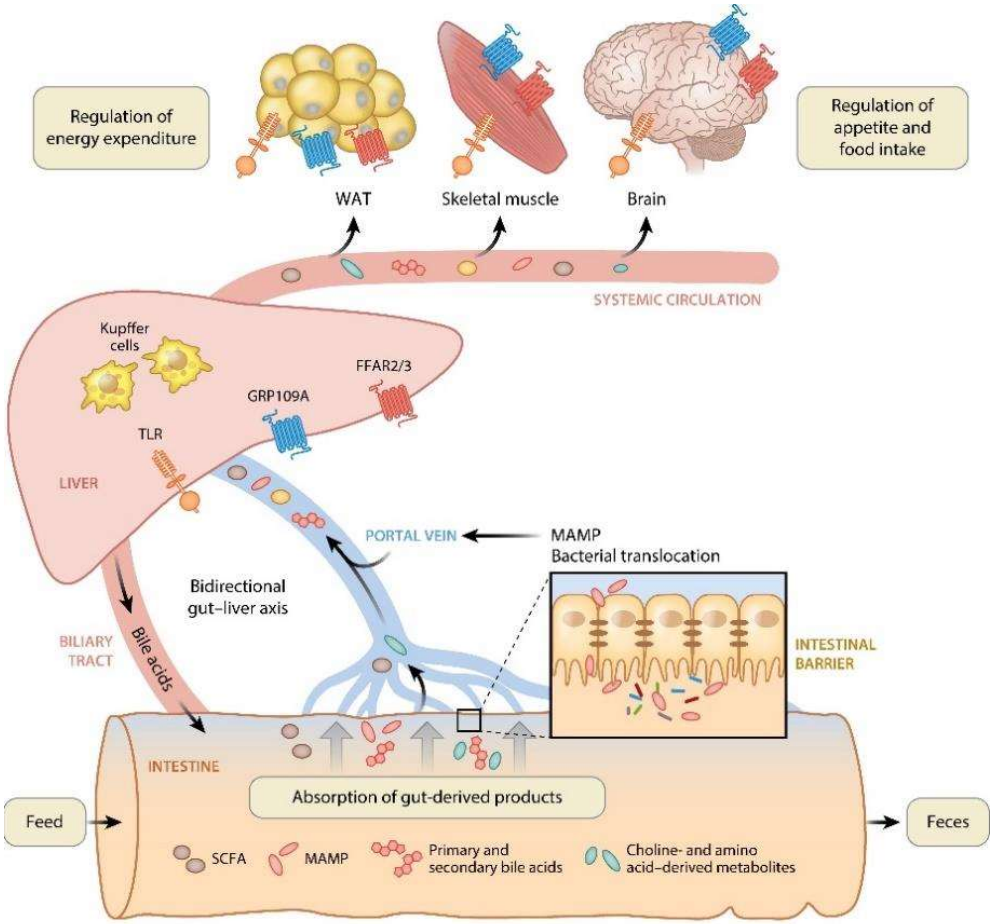


Figure 36 : L'axe intestin-foie dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire chez les animaux (Ringseis et al., 2020).

(acides gras à chaîne courte, etc.). Les stratégies capables de cibler le microbiote intestinal sont également considérées comme un levier d'action pour réguler le métabolisme protéino-énergétique, le développement et la fonctionnalité du muscle (Chen et al., 2016 ; Byeon et al., 2022 ; Giron et al., 2022). Le dialogue entre la sphère digestive des lignées pHu (29 jours d'âge, 15ème génération) et le métabolisme musculaire fait actuellement l'objet d'une thèse au sein de l'unité *Biologie des Oiseaux et Aviculture* du centre INRAE Val de Loire.

Biomarqueurs, statut énergétique et robustesse

Dans le liquide allantoïque, des signatures spécifiques en lien avec le métabolisme énergétique, le métabolisme des purines et le métabolisme à un carbone ont été observées dès le stade E10. En comparaison aux pHu- qui disposent d'une abondance plus élevée en substrats énergétiques comme le glucose, la créatine ou encore le nicotinate, plusieurs métabolites issus de la β-oxydation des acides gras et du catabolisme des acides aminés ont été identifiés chez les pHu+. Ces résultats ouvrent des perspectives sur l'identification de biomarqueurs du métabolisme des embryons (pHu+ vs pHu- / mâles vs femelles) pour des applications en sélection ou des raisons éthiques et économiques visant à améliorer la robustesse des poussins et déterminer le sexe des embryons avant l'éclosion.

Dans le cadre du projet CASDAR Chick'Tip, des analyses ciblées et sans à priori ont permis de définir une liste restreinte de biomarqueurs/indicateurs de la qualité du poussin et/ou de leur statut énergétique (poids vif, température corporelle, teneurs en anticorps maternels dans le sang, etc.). De façon originale, un déterminisme plutôt marqué ($h^2 > 0,30$) a été observé pour les indicateurs du statut antioxydant des poussins (acide urique, statut antioxydant total). Ces indicateurs sont en cours de validation et semblent mesurables plus précocement dans le liquide allantoïque des œufs pour certains d'entre eux. Ainsi, ils pourraient faire l'objet de futurs critères de sélection et constituer un levier d'action pour améliorer la robustesse des poussins après l'éclosion. D'autres études ont montré que les teneurs en œstradiol sont plus élevées dans le liquide allantoïque des femelles entre le 13ème et 18ème jour d'incubation voire encore plus précocement (Tran et al., 2010 ; Weissmann et al., 2013). De la même façon, des marqueurs tels que les hormones pourraient être utiles pour les stratégies d'ovosexage, développées afin de limiter voire interdire l'élimination des poussins mâles.

Conclusion et perspectives

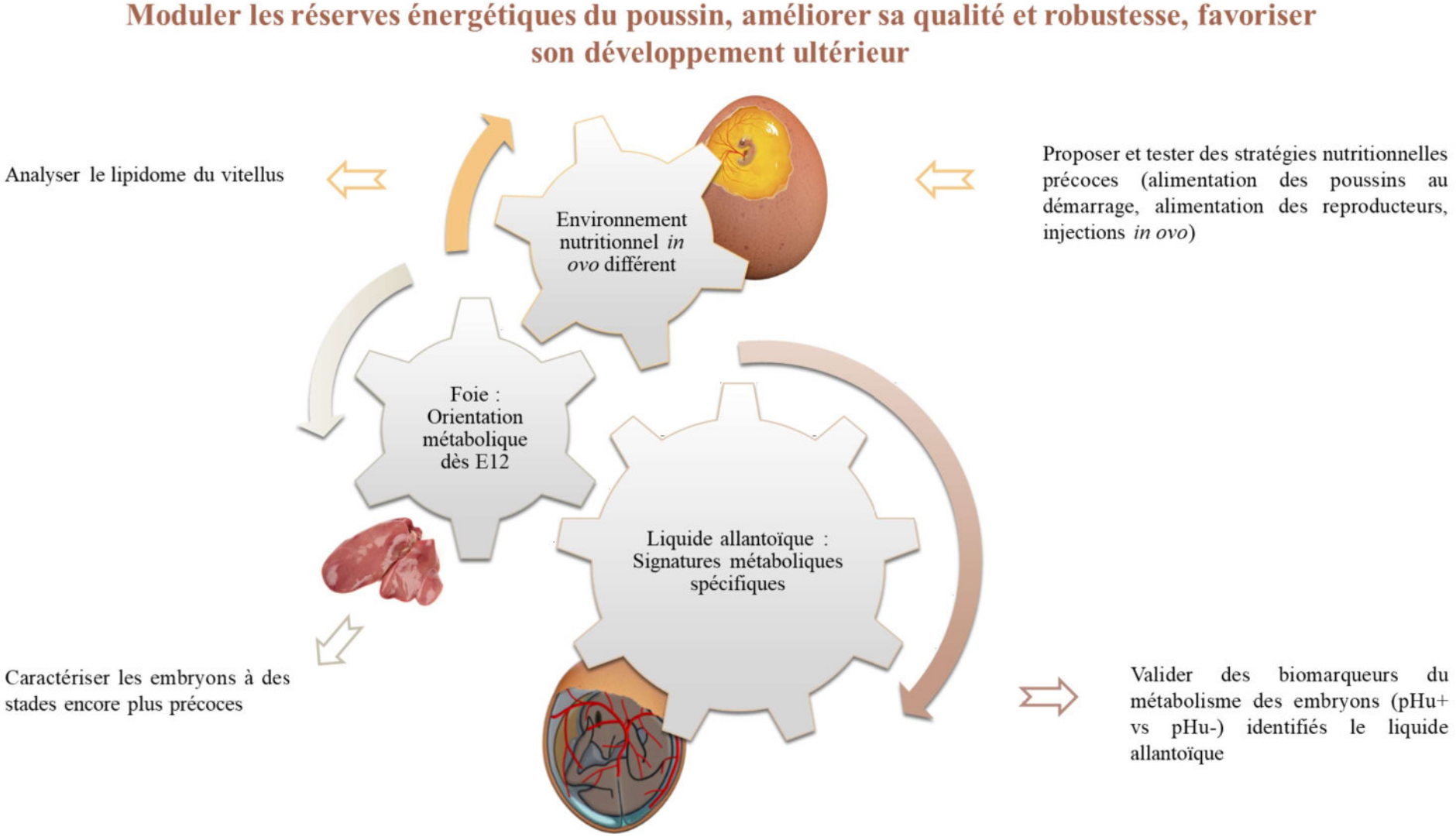


Figure 37 : Représentation des principales conclusions et perspectives de l'étude.

L'objectif de la thèse était de caractériser l'environnement nutritionnel des embryons et comprendre la mise en place de l'orientation métabolique précoce qui conditionne le phénotype ultérieur des poulets de chair. Pour atteindre cet objectif et répondre aux enjeux de la filière, nous avons utilisé un modèle unique de deux lignées divergentes pour le pH ultime de la viande, critère reflétant les réserves en glycogène musculaire. Nos travaux ont permis de caractériser les principales sources de nutriments de l'œuf montrant des différences de composition dès le début du développement embryonnaire (**Fig. 37**). Les effets de la génétique et de l'environnement nutritionnel n'ont pas été sans conséquence sur le métabolisme hépatique. Bien que le foie ne soit pas le tissu cible de la sélection, l'orientation métabolique semble établie dès E12. Au niveau musculaire, les différences entre lignées sont davantage exacerbées après l'éclosion sous l'effet d'une alimentation exogène. Le métabolome du liquide allantoïque a révélé des signatures métaboliques spécifiques à chaque lignée. Comme observé à des stades plus tardifs, les embryons pHu+ ont recours à différentes voies cataboliques telles que la β-oxydation des acides gras, le catabolisme des acides aminés et la glycogénolyse pour produire de l'énergie. Les pHu-, quant à eux, sollicitent davantage le métabolisme glucidique. D'autre part, les animaux ayant le moins de réserves énergétiques (pHu+) sont plus impactés par le processus d'éclosion, sont moins robustes et donc plus sujets aux risques de mortalité durant la première semaine de vie.

Au-delà des études et réflexions actuellement en cours pour caractériser les embryons à des stades encore plus précoces et analyser le lipidome du vitellus, nos résultats ouvrent des perspectives sur l'utilisation de stratégies nutritionnelles précoces (alimentation des poussins au démarrage, alimentation des reproducteurs, injections *in ovo*) visant à moduler les réserves énergétiques du poussin, améliorer sa qualité et robustesse mais aussi favoriser son développement ultérieur. Les effets de l'alimentation des reproducteurs et des injections *in ovo* pourront être évalués grâce au suivi précoce des biomarqueurs identifiés dans le liquide allantoïque au cours de ma thèse.

Références

Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Mol Aspects Med. 2015;46:34-45.

Ahmed TAE, Cordeiro CMM, Elebute O, Hincke MT. Proteomic Analysis of Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) during Embryonic Development Provides Functional Insight. Biomed Res Int. 2022;2022:7813921.

Alkie TN, Yitbarek A, Hodgins DC, Kulkarni RR, Taha-Abdelaziz K, Sharif S. Development of innate immunity in chicken embryos and newly hatched chicks: a disease control perspective. Avian Pathol. 2019;48(4):288-310.

Alnahhas N, Berri C, Boulay M, Baéza E, Jégo Y, Baumard Y, Chabault M, Le Bihan-Duval E. Selecting broiler chickens for ultimate pH of breast muscle: analysis of divergent selection experiment and phenotypic consequences on meat quality, growth, and body composition traits. J Anim Sci. 2014;92(9):3816-24.

Alnahhas N, Le Bihan-Duval E, Baéza E, Chabault M, Chartrin P, Bordeau T, Cailleau-Audouin E, Meteau K, Berri C. Impact of divergent selection for ultimate pH of pectoralis major muscle on biochemical, histological, and sensorial attributes of broiler meat. J Anim Sci. 2015;93(9):4524-31.

Alnahhas N, Berri C, Chabault M, Chartrin P, Boulay M, Bourin MC, Le Bihan-Duval E. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. BMC Genet. 2016;17:61.

Andrieux C, Petit A, Collin A, Houssier M, Métayer-Coustard S, Panserat S, Pitel F, Coustham V. Early phenotype programming in birds by temperature and nutrition: A mini-review. Front Anim Sci. 2022;2.

Beauclercq S, Baéza E, Bordeau T, Chartrin P, Godet E, Le Bihan-Duval E, Berri C. Conséquence d'une sélection sur le pH ultime de la viande sur la typologie et le métabolisme énergétique du muscle chez le poulet de chair. 11èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, Mars 2015.

Beauclercq S, Nadal-Desbarats L, Hennequet-Antier C, Collin A, Tesseraud S, Bourin M, Le Bihan-Duval E, Berri C. Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality. J Proteome Res. 2016;15(4):1168-78.

Beauclercq S, Hennequet-Antier C, Praud C, Godet E, Collin A, Tesseraud S, Métayer-Coustard S, Bourin M, Moroldo M, Martins F, Lagarrigue S, Bihan-Duval EL, Berri C. Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. Sci Rep. 2017;7(1):6447.

Bellairs R, Osmond M. The Atlas of Chick Development. Academic Press Inc 1998; p. 125.

Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. Curr Opin Cell Biol. 2017;45:72-82.

Berger Q, Guettier E, Bernard J, Ganier P, Chahnamian M, Le Bihan-Duval E, Mignon-Grasteau S. Profiles of genetic parameters of body weight and feed efficiency in two divergent broiler lines for meat ultimate pH. BMC Genom Data. 2022;23(1):18.

Bertin A, Meurisse M, Arnould C, Leterrier C, Constantin P, Cornilleau F, Vaudin P, Burlot T, Delaveau J, Rat C, Calandreau L. Yolk hormones influence in ovo chemosensory learning, growth, and feeding behavior in domestic chicks. Dev Psychobiol. 2016;58(2):185-97.

Bigot K, Taouis M, Picard M, Tesseraud S. Early post-hatching starvation delays p70 S6 kinase activation in the muscle of neonatal chicks. Br J Nutr. 2003;90(6):1023-9.

Bihan-Duval EL, Hennequet-Antier C, Berri C, Beauclercq SA, Bourin MC, Boulay M, Demeure O, Boitard S. Identification of genomic regions and candidate genes for chicken meat ultimate pH by combined detection of selection signatures and QTL. BMC Genomics. 2018;19(1):294.

Birk JB, Wojtaszewski JF. Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. J Physiol. 2006;577(Pt 3):1021-32.

Bourin M, Gautron J, Berges M, Nys Y, Réhault-Godbert S. Sex- and tissue-specific expression of "similar to nothepsin" and cathepsin D in relation to egg yolk formation in Gallus gallus. Poult Sci. 2012;91(9):2288-93.

Brandl K, Kumar V, Eckmann L. Gut-liver axis at the frontier of host-microbial interactions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017;312(5):G413-G419.

Burns RA, Buttery PJ. Purine metabolism and urate biosynthesis in isolated chicken hepatocytes. Arch Biochem Biophys. 1984;233(2):507-14.

Byeon HR, Jang SY, Lee Y, Kim D, Hong MG, Lee D, Shin JH, Seo JG. New Strains of Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii are Effective for Improving the Muscle Strength of Mice with Immobilization-Induced Muscular Atrophy. J Med Food. 2022;25(6):565-575.

Caputo M, Pigni S, Agosti E, Daffara T, Ferrero A, Filigheddu N, Prodam F. Regulation of GH and GH Signaling by Nutrients. Cells. 2021;10(6):1376.

Carver FM, Shibley IA Jr, Pennington JS, Pennington SN. Differential expression of glucose transporters during chick embryogenesis. Cell Mol Life Sci. 2001;58(4):645-52.

Chadt A, Al-Hasani H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. Pflugers Arch. 2020;472(9):1273-1298.

Chen W, Chen Y, Liu Y, Wang X. Autophagy in muscle regeneration: potential therapies for myopathies. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2022;13(3):1673-1685.

Chen W, Lv YT, Zhang HX, Ruan D, Wang S, Lin YC. Developmental specificity in skeletal muscle of late-term avian embryos and its potential manipulation. Poult Sci. 2013;92(10):2754-64.

Chen YM, Wei L, Chiu YS, Hsu YJ, Tsai TY, Wang MF, Huang CC. Lactobacillus plantarum TWK10 Supplementation Improves Exercise Performance and Increases Muscle Mass in Mice. Nutrients. 2016;8(4):205.

Cogburn LA, Trakooljul N, Chen C, Huang H, Wu CH, Carré W, Wang X, White HB 3rd. Transcriptional profiling of liver during the critical embryo-to-hatchling transition period in the chicken (Gallus gallus). BMC Genomics. 2018;19(1):695.

Cogburn LA, Trakooljul N, Wang X, Ellestad LE, Porter TE. Transcriptome analyses of liver in newly-hatched chicks during the metabolic perturbation of fasting and re-feeding reveals THRSPA as the key lipogenic transcription factor. BMC Genomics. 2020;21(1):109.

Coudert E, Pascal G, Dupont J, Simon J, Cailleau-Audouin E, Crochet S, Duclos MJ, Tesseraud S, Métayer-Coustard S. Phylogenesis and Biological Characterization of a New Glucose Transporter in the Chicken (Gallus gallus), GLUT12. PLoS One. 2015;10(10):e0139517.

Coudert E, Praud C, Dupont J, Crochet S, Cailleau-Audouin E, Bordeau T, Godet E, Collin A, Berri C, Tesseraud S, Métayer-Coustard S. Expression of glucose transporters SLC2A1,

SLC2A8, and SLC2A12 in different chicken muscles during ontogenesis. J Anim Sci. 2018;96(2):498-509.

Da Silva M, Labas V, Nys Y, Réhault-Godbert S. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. Poult Sci. 2017;96(8):2931-2941.

Da Silva M, Dombre C, Brionne A, Monget P, Chessé M, De Pauw M, Mills M, Combes-Soia L, Labas V, Guyot N, Nys Y, Réhault-Godbert S. The Unique Features of Proteins Depicting the Chicken Amniotic Fluid. Mol Cell Proteomics. 2019;18(Suppl 1):S174-S190.

Dang X, Zhou H, Lou Y, Liu X, Li D. Development of breast muscle parameters, glycogen reserves, and myogenic gene expression in goslings during pre- and post-hatching periods. Front Physiol. 2022;13:990715.

Dayan J, Melkman-Zehavi T, Reicher N, Braun U, Inhuber V, Mabjeesh SJ, Halevy O, Uni Z. Supply and demand of creatine and glycogen in broiler chicken embryos. Front Physiol. 2023;14:1079638.

De Oliveira J, Uni Z, Ferket P. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. World's Poultry Science Journal. 2008;64(4):488-499.

Decuypere E, Bruggeman V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. Poult Sci. 2007;86(5):1037-42.

Delibegovic M, Armstrong CG, Dobbie L, Watt PW, Smith AJ, Cohen PT. Disruption of the striated muscle glycogen targeting subunit PPP1R3A of protein phosphatase 1 leads to increased weight gain, fat deposition, and development of insulin resistance. Diabetes. 2003;52(3):596-604.

Ding X, Peng C, Li S, Li M, Li X, Wang Z, Li Y, Wang X, Li J, Wu J. Chicken serum uric acid level is regulated by glucose transporter 9. Anim Biosci. 2021;34(4):670-679.

Duchêne S, Métayer S, Audouin E, Bigot K, Dupont J, Tesseraud S. Refeeding and insulin activate the AKT/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. Domest Anim Endocrinol. 2008;34(1):1-13.

Dunnington EA, Siegel PB. Thermoregulation in newly hatched chicks. Poult Sci. 1984;63(7):1303-13.

Dupont J, Holzenberger M. Biology of insulin-like growth factors in development. Birth Defects Res C Embryo Today. 2003;69(4):257-71.

Dupont J, Tesseraud S, Derouet M, Collin A, Rideau N, Crochet S, Godet E, Cailleau-Audouin E, Métayer-Coustard S, Duclos MJ, Gespach C, Porter TE, Cogburn LA, Simon J. Insulin immuno-neutralization in chicken: effects on insulin signaling and gene expression in liver and muscle. J Endocrinol. 2008;197(3):531-42.

Dupont J, Tesseraud S, Simon J. Insulin signaling in chicken liver and muscle. Gen Comp Endocrinol. 2009;163(1-2):52-7.

Dymond J, Vinyard B, Nicholson AD, French NA, Bakst MR. Short periods of incubation during egg storage increase hatchability and chick quality in long-stored broiler eggs. Poult Sci. 2013;92(11):2977-87.

Ellegren H, Hultin-Rosenberg L, Brunström B, Dencker L, Kultima K, Scholz B. Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes. BMC Biol. 2007;5:40.

Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290(4):E612-21.

Flamant F. De l'œuf à la poule. Belin. 2001.

Fortuna R, Paquet M, Biard C, Élard L, Ferreira AC, Leroux-Coyaux M, Parenteau C, Silva LR, Théron F, Covas R, Doutrelant C. Egg components and offspring survival vary with group size and laying order in a cooperative breeder. Oecologia. 2023;202(1):129-142.

Franssens L, Lesuisse J, Wang Y, Willems E, Willemsen H, Koppenol A, Guo X, Buyse J, Decuypere E, Everaert N. The effect of insulin on plasma glucose concentrations, expression of hepatic glucose transporters and key gluconeogenic enzymes during the perinatal period in broiler chickens. Gen Comp Endocrinol. 2016;232:67-75.

Franzoni A. Characterization of hatching egg quality, of reproductive performances and modelling of the embryonic development in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of *Pectoralis major* muscle. Tesi di laurea, Universita di Pisa. 2019.

Giron M, Thomas M, Dardevet D, Chassard C, Savary-Auzeloux I. Gut microbes and muscle function: can probiotics make our muscles stronger? J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2022;13(3):1460-1476.

Givisiez PEN, Moreira Filho ALB, Santos MRB, Oliveira HB, Ferket PR, Oliveira CJB, Malheiros RD. Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. Poult Sci. 2020;99(12):6774-6782.

Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. J Anim Sci. 2008;86(14 Suppl):E19-35.

Grommen SV, Iwasawa A, Beck V, Darras VM, De Groef B. Ontogenic expression profiles of thyroid-specific genes in embryonic and hatching chicks. Domest Anim Endocrinol. 2011;40(1):10-8.

Groothuis TG, Müller W, von Engelhardt N, Carere C, Eising C. Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. Neurosci Biobehav Rev. 2005;29(2):329-52.

Guyot N, Réhault-Godbert S, Slugocki C, Harichaux G, Labas V, Helloin E, Nys Y. Characterization of egg white antibacterial properties during the first half of incubation: A comparative study between embryonated and unfertilized eggs. Poult Sci. 2016;95(12):2956-2970.

Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(1):31-44.

Hamburger V, Hamilton HL. « Une série d'étapes normales dans le développement de l'embryon de poulet ». Journal de morphologie. 1951;88(1):49-92.

Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. Exp Mol Med. 2016;48(3):e218.

Haron A, Dahan Y, Shinder D, Druyan S. Physiological effects of hypoxic conditions during the plateau period on the chicken embryo. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2017;203:32-39.

Henry MH, Burke WH. Sexual dimorphism in broiler chick embryos and embryonic muscle development in late incubation. Poult Sci. 1998;77(5):728-36.

Henry MH, Burke WH. The effects of in ovo administration of testosterone or an antiandrogen on growth of chick embryos and embryonic muscle characteristics. Poult Sci. 1999;78(7):1006-13.

Hinkle JS, Rivera CN, Vaughan RA. Branched-Chain Amino Acids and Mitochondrial Biogenesis: An Overview and Mechanistic Summary. Mol Nutr Food Res. 2022;66(20):e2200109.

Jørgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. J Physiol. 2006;574(Pt 1):17-31.

Karpala AJ, Bagnaud-Baule A, Goossens KE, Lowenthal JW, Bean AG. Ontogeny of the interferon system in chickens. J Reprod Immunol. 2012;94(2):169-74.

Ke R, Xu Q, Li C, Luo L, Huang D. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. Cell Biol Int. 2018;42(4):384-392.

Kim WK, Singh AK, Wang J, Applegate T. Functional role of branched chain amino acids in poultry: a review. Poult Sci. 2022;101(5):101715.

Kino K, Okumura J. Improvement of body weight and nitrogen balance of chicks fed histidine-free or lysine-free diets with supplementation of graded levels of sulfur-containing amino acids. Poult Sci. 1986;65(9):1736-40.

Kono T, Nishida M, Nishiki Y, Seki Y, Sato K, Akiba Y. Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. Br Poult Sci. 2005;46(4):510-5.

Kornasio R, Halevy O, Kedar O, Uni Z. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. Poult Sci. 2011;90(7):1467-77.

Kuttappan VA, Hargis BM, Owens CM. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. Poult Sci. 2016;95(11):2724-2733.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell. 2012;149(2):274-93.

Lei Q, Hu X, Han H, Wang J, Liu W, Zhou Y, Cao D, Li F, Liu J. Integrative analysis of circRNA, miRNA, and mRNA profiles to reveal ceRNA regulation in chicken muscle development from the embryonic to post-hatching periods. BMC Genomics. 2022;23(1):342.

Lin SC, Hardie DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. Cell Metab. 2018;27(2):299-313.

Liu J, Lei Q, Li F, Zhou Y, Gao J, Liu W, Han H, Cao D. Dynamic Transcriptomic Analysis of Breast Muscle Development From the Embryonic to Post-hatching Periods in Chickens. Front Genet. 2020;10:1308.

Liu L, Cui HX, Zheng MQ, Zhao GP, Wen J. Comparative analysis of differentially expressed genes related to triglyceride metabolism between intramuscular fat and abdominal fat in broilers. Br Poult Sci. 2018;59(5):514-520.

Liu R, Wang H, Liu J, Wang J, Zheng M, Tan X, Xing S, Cui H, Li Q, Zhao G, Wen J. Uncovering the embryonic development-related proteome and metabolome signatures in breast muscle and intramuscular fat of fast-and slow-growing chickens. BMC Genomics. 2017;18(1):816.

Liu X, Liu L, Wang J, Cui H, Zhao G, Wen J. FOSL2 Is Involved in the Regulation of Glycogen Content in Chicken Breast Muscle Tissue. Front Physiol. 2021;12:682441.

Liu Y, Guo W, Pu Z, Li X, Lei X, Yao J, Yang X. Developmental changes of Insulin-like growth factors in the liver and muscle of chick embryos. Poult Sci. 2016;95(6):1396-402.

Lu JW, McMurtry JP, Coon CN. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. Poult Sci. 2007;86(4):673-83.

Maatjens CM, van Roovert-Reijrink IAM, Engel B, van der Pol CW, Kemp B, van den Brand H. Temperature during the last week of incubation. III. Effects on chicken embryo physiology. Poult Sci. 2017;96(5):1451-1458.

Manáková E, Titlbach M. Development of the chick pancreas with regard to estimation of the relative occurrence and growth of endocrine tissue. Anat Histol Embryol. 2007;36(2):127-34.

Mann K. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. Proteomics. 2008;8(11):2322-32.

Mattick JSA, Kamisoglu K, Ierapetritou MG, Androulakis IP, Berthiaume F. Branched-chain amino acid supplementation: impact on signaling and relevance to critical illness. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2013;5(4):449-460.

McMurtry JP, Francis GL, Upton Z. Insulin-like growth factors in poultry. Domest Anim Endocrinol. 1997;14(4):199-229.

Meijer AJ, Dubbelhuis PF. Amino acid signalling and the integration of metabolism. Biochem Biophys Res Commun. 2004;313(2):397-403.

Métayer-Coustard S, Petit A, Quentin M, Tesseraud S. Nouvelles stratégies alimentaires précoces au service de la production avicole. INRAE Prod Anim. 2019;32(3):417-430.

Métayer-Coustard S, Tesseraud S, Praud C, Royer D, Bordeau T, Coudert E, Cailleau-Audouin E, Godet E, Delaveau J, Le Bihan-Duval E, Berri C. Early Growth and Protein-Energy Metabolism in Chicken Lines Divergently Selected on Ultimate pH. Front Physiol. 2021;12:643580.

Métayer-Coustard S, Béthuel JC, Collin A, Le Bihan-Duval E, Puterflam J, Travel A. Qualité du poussin : indicateurs et leviers. 14ème Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie-Gras (JRA), Mars 2022, Tours, France.

Molenaar R, van den Borne JJ, Hazejager E, Kristensen NB, Heetkamp MJ, Meijerhof R, Kemp B, van den Brand H. High environmental temperature increases glucose requirement in the developing chicken embryo. PLoS One. 2013;8(4):e59637.

Monin G, Sellier P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. Meat Sci. 1985;13(1):49-63.

Moran ET Jr. Nutrition of the developing embryo and hatchling. Poult Sci. 2007;86(5):1043-9.

Muramatsu T, Aoyagi Y, Okumura J, Tasaki I. Contribution of whole-body protein synthesis to basal metabolism in layer and broiler chickens. Br J Nutr. 1987;57(2):269-77.

Nabi F, Arain MA, Rajput N, Alagawany M, Soomro J, Umer M, Soomro F, Wang Z, Ye R, Liu J. Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2020;104(6):1809-1818.

Nangsuay A, Meijerhof R, van den Anker I, Heetkamp MJW, Kemp B, van den Brand H. Effects of breeder age, strain, and eggshell temperature on nutrient metabolism of broiler embryos. Poult Sci. 2017;96(6):1891-1900.

Navara KJ, Mendonça MT. Yolk androgens as pleiotropic mediators of physiological processes: a mechanistic review. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2008;150(4):378-86.

Nie C, He T, Zhang W, Zhang G, Ma X. Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. Int J Mol Sci. 20183;19(4):954.

Noble RC, Cocchi M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. Prog Lipid Res. 1990;29(2):107-40.

Obianwuna UE, Oleforuh-Okoleh VU, Wang J, Zhang HJ, Qi GH, Qiu K, Wu SG. Potential Implications of Natural Antioxidants of Plant Origin on Oxidative Stability of Chicken Albumen during Storage: A Review. Antioxidants (Basel). 2022;11(4):630.

OCDE/FAO (2021), Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2021-2030, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/e32fb104-fr.

Panserat S, Marandel L, Seiliez I, Skiba-Cassy S. New Insights on Intermediary Metabolism for a Better Understanding of Nutrition in Teleosts. Annu Rev Anim Biosci. 2019;7:195-220.

Paudel RR, Lu D, Roy Chowdhury S, Monroy EY, Wang J. Targeted Protein Degradation via Lysosomes. Biochemistry. 2023;62(3):564-579.

Peng M, Li S, He Q, Zhao J, Li L, Ma H. Proteomics reveals changes in hepatic proteins during chicken embryonic development: an alternative model to study human obesity. BMC Genomics. 2018;19(1):29.

Peng ML, Li SN, He QQ, Zhao JL, Li LL, Ma HT. Based serum metabolomics analysis reveals simultaneous interconnecting changes during chicken embryonic development. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2018;102(5):1210-1219.

Petit A, Réhault-Godbert S, Nadal-Desbarats L, Cailleau-Audouin E, Chartrin P, Raynaud E, Jimenez J, Tesseraud S, Berri C, Le Bihan-Duval E, Métayer-Coustard S. Nutrient sources differ in the fertilised eggs of two divergent broiler lines selected for meat ultimate pH. Sci Rep. 2022;12(1):5533.

Petit A, Tesseraud S, Beauclercq S, Nadal-Desbarats L, Cailleau-Audouin E, Réhault-Godbert S, Berri C, Le Bihan-Duval E, Métayer-Coustard S. Allantoic fluid metabolome reveals specific metabolic signatures in chicken lines different for their muscle glycogen content. Sci Rep. 2023;13(1):8867.

Petracci M, Soglia F, Madruga M, Carvalho L, Ida E, Estévez M. Wooden-Breast, White Striping, and Spaghetti Meat: Causes, Consequences and Consumer Perception of Emerging Broiler Meat Abnormalities. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2019;18(2):565-583.

Pilz KM, Quiroga M, Schwabl H, Adkins-Regan E. European starling chicks benefit from high yolk testosterone levels during a drought year. Horm Behav. 2004;46(2):179-92.

Pokhrel N, Sela-Donenfeld D, Cinnamon Y. The chick blastoderm during diapause, a landmark for optimization of preincubation storage conditions. Poult Sci. 2021;100(8):101227.

Praud C, Jimenez J, Pampouille E, Couroussé N, Godet E, Le Bihan-Duval E, Berri C. Molecular Phenotyping of White Striping and Wooden Breast Myopathies in Chicken. Front Physiol. 2020;11:633.

Qiao M, Fletcher DL, Smith DP, Northcutt JK. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. Poult Sci. 2001;80(5):676-80.

Rehault-Godbert S, Baron F, Mignon-Grasteau S, Labas V, Gautier M, Hincke MT, Nys Y. Effect of temperature and time of storage on protein stability and anti-salmonella activity of egg white. J Food Prot. 2010;73(9):1604-12.

Réhault-Godbert S, Hervé-Grépinet V, Gautron J, Cabau C, Nys Y, Hincke M. Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Woodhead Publishing. 2011:183-208.

Reis LH, Gama LT, Soares MC. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights. Poult Sci. 1997;76(11):1459-66.

Ren L, Liu A, Wang Q, Wang H, Dong D, Liu L. Transcriptome analysis of embryonic muscle development in Chengkou Mountain Chicken. BMC Genomics. 2021;22(1):431.

Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. Mech Dev. 2016;141:70-77.

Ringseis R, Gessner DK, Eder K. The Gut-Liver Axis in the Control of Energy Metabolism and Food Intake in Animals. Annu Rev Anim Biosci. 2020;8:295-319.

Rippamonti J, Dzialowski EM. Thyroid hormone manipulation influences development of endothermy and hatching in white leghorn chickens (Gallus gallus). J Therm Biol. 2023;114:103582.

Rossetti ML, Steiner JL, Gordon BS. Androgen-mediated regulation of skeletal muscle protein balance. Mol Cell Endocrinol. 2017;447:35-44.

Rubio LA. Possibilities of early life programming in broiler chickens via intestinal microbiota modulation. Poult Sci. 2019;98(2):695-706.

Saeed M, Babazadeh D, Naveed M, Alagawany M, Abd El-Hack ME, Arain MA, Tiwari R, Sachan S, Karthik K, Dhama K, Elnesr SS, Chao S. In ovo delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in poultry: current knowledge. J Sci Food Agric. 2019;99(8):3727-3739.

Sahan U, Ipek A, Sozcu A. Yolk sac fatty acid composition, yolk absorption, embryo development, and chick quality during incubation in eggs from young and old broiler breeders. Poult Sci. 2014;93(8):2069-77.

Saini RK, Keum YS. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. Food Chem. 2018;240:90-103.

Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. La reproduction animale et humaine. Editions Quae 2014; p. 409-424.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414(6865):799-806.

Sato M, Tachibana T, Furuse M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2006;143(3):382-8.

Sauver B. Reproduction des volailles et production d'œuf. INRA 1988; p. 28.

Savage DB, Zhai L, Ravikumar B, Choi CS, Snaar JE, McGuire AC, Wou SE, Medina-Gomez G, Kim S, Bock CB, Segvich DM, Solanky B, Deelchand D, Vidal-Puig A, Wareham NJ, Shulman GI, Karpe F, Taylor R, Pederson BA, Roach PJ, O'Rahilly S, DePaoli-Roach AA. A prevalent variant in PPP1R3A impairs glycogen synthesis and reduces muscle glycogen content in humans and mice. PLoS Med. 2008;5(1):e27.

Scheuermann GN, Bilgili SF, Tuzun S, Mulvaney DR. Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. Poult Sci. 2004;83(8):1404-12.

Shimamoto S, Ijiri D, Kawaguchi M, Nakashima K, Ohtsuka A. Gene expression pattern of glucose transporters in the skeletal muscles of newly hatched chicks. Biosci Biotechnol Biochem. 2016;80(7):1382-5.

Situation du marché des volailles de chair. Service économie ITAVI. Edition Mars 2021. https://www.itavi.asso.fr/publications/note-de-conjoncture-volailles-de-chair-mars-2021

Spaulding HR, Yan Z. AMPK and the Adaptation to Exercise. Annu Rev Physiol. 2022;84:209-227.

Speier JS, Yadgary L, Uni Z, Wong EA. Gene expression of nutrient transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick. Poult Sci. 2012;91(8):1941-9.

Surai AP, Surai PF, Steinberg W, Wakeman WG, Speake BK, Sparks NH. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. Br Poult Sci. 2003;44(4):612-9.

Surai PF, Sparks NH. Comparative evaluation of the effect of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. Br Poult Sci. 2001;42(2):252-9.

Surai PF, Fisinin VI, Karadas F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. Anim Nutr. 2016;2(1):1-11.

Surugihalli C, Porter TE, Chan A, Farley LS, Maguire M, Zhang C, Kattapuram N, Muyyarikkandy MS, Liu HC, Sunny NE. Hepatic Mitochondrial Oxidative Metabolism and Lipogenesis Synergistically Adapt to Mediate Healthy Embryonic-to-Neonatal Transition in Chicken. Sci Rep. 2019;9(1):20167.

Szwed A, Kim E, Jacinto E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. Physiol Rev. 2021;101(3):1371-1426.

Tasharofi S, Mohammadi F, Amiri N, Nazem MN. Effects of intra-yolk-sac injection of dextrose and albumin on performance, jejunum morphology, liver and pectoral muscle glycogen and some serum metabolites of broilers. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2018;102(4):917-923.

Tesseraud S. Métabolisme protéique chez le poulet en croissance. Effet des protéines alimentaires. INRAE Prod Anim. 1995;8(3) :1997-212.

Tesseraud S, Peresson R, Chagneau AM. Age-related changes of protein turnover in specific tissues of the chick. Poult Sci. 1996;75(5):627-31.

Tesseraud S, Métayer Coustard S, Collin A, Seiliez I. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. Br J Nutr. 2009;101(8):1132-9.

Tiraby C, Langin D. PGC-1alpha, un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme [PGC-1alpha, a transcriptional coactivator involved in metabolism]. Med Sci (Paris). 2005;21(1):49-54.

Tokushima Y, Sulistiyanto B, Takahashi K, Akiba Y. Insulin-glucose interactions characterised in newly hatched broiler chicks. Br Poult Sci. 2003;44(5):746-51.

Tomas FM, Pym RA, Johnson RJ. Muscle protein turnover in chickens selected for increased growth rate, food consumption or efficiency of food utilisation: effects of genotype and relationship to plasma IGF-I and growth hormone. Br Poult Sci. 1991;32(2):363-76.

Tona K, Bamelis F, De Ketelaere B, Bruggeman V, Moraes VM, Buyse J, Onagbesan O, Decuypere E. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. Poult Sci. 2003;82(5):736-41.

Tran HT, Ferrell W, Butt TR. An estrogen sensor for poultry sex sorting. J Anim Sci. 2010;88(4):1358-64.

Tsahar E, Arad Z, Izhaki I, Guglielmo CG. The relationship between uric acid and its oxidative product allantoin: a potential indicator for the evaluation of oxidative stress in birds. J Comp Physiol B. 2006;176(7):653-61.

Uni Z, Ferket PR, Tako E, Kedar O. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poult Sci. 2005;84(5):764-70.

Uni Z, Ferket PR, Tako E, Kedar O. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poult Sci. 2005;84(5):764-70.

van de Ven LJ, van Wagenberg AV, Debonne M, Decuypere E, Kemp B, van den Brand H. Hatching system and time effects on broiler physiology and posthatch growth. Poult Sci. 2011;90(6):1267-75.

Van der Wagt I, de Jong IC, Mitchell MA, Molenaar R, van den Brand H. A review on yolk sac utilization in poultry. Poult Sci. 2020;99(4):2162-2175.

Van Milgen J. The role of energy, serine, glycine, and 1-carbon units in the cost of nitrogen excretion in mammals and birds. Animal. 2021;15(5):100213.

Waclawek M, Foisner R, Nimpf J, Schneider WJ. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. Biol Reprod. 1998;59(5):1230-9.

Walter I, Hegarty B, Seebacher F. AMP-activated protein kinase controls metabolism and heat production during embryonic development in birds. J Exp Biol. 2010;213(Pt 18):3167-76.

Wang G, Kim WK, Cline MA, Gilbert ER. Factors affecting adipose tissue development in chickens: A review. Poult Sci. 2017;96(10):3687-3699.

Washington TA, Haynie WS, Schrems ER, Perry RA Jr, Brown LA, Williams BM, Rosa-Caldwell ME, Lee DE, Brown JL. Effects of PGC-1α overexpression on the myogenic response during skeletal muscle regeneration. Sports Med Health Sci. 2022;4(3):198-208.

Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Gottschalk J, Einspanier A. Sexing domestic chicken before hatch: a new method for in ovo gender identification. Theriogenology. 2013;80(3):199-205.

Wong EA, Uni Z. Centennial Review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. Poult Sci. 2021;100(3):100821.

Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids. 2009;37(1):1-17.

Yadgary L, Yair R, Uni Z. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. Poult Sci. 2011;90(2):410-6.

Yadgary L, Uni Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. Poult Sci. 2012;91(2):444-53.

Yadgary L, Kedar O, Adepeju O, Uni Z. Changes in yolk sac membrane absorptive area and fat digestion during chick embryonic development. Poult Sci. 2013;92(6):1634-40.

Zhang SO, Mathur S, Hattem G, Tassy O, Pourquié O. Sex-dimorphic gene expression and ineffective dosage compensation of Z-linked genes in gastrulating chicken embryos. BMC Genomics. 2010;11:13.

Zhao MM, Gao T, Zhang L, Li JL, Lv PA, Yu LL, Gao F, Zhou GH. Effects of in ovo feeding of creatine pyruvate on the hatchability, growth performance and energy status in embryos and broiler chickens. Animal. 2017;11(10):1689-1697.

Zhao MM, Gong DQ, Gao T, Zhang L, Li JL, Lv PA, Yu LL, Gao F, Zhou GH. In ovo feeding of creatine pyruvate modulates growth performance, energy reserves and mRNA expression levels of gluconeogenesis and glycogenesis enzymes in liver of embryos and neonatal broilers. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2018;102(2):e758-e767.

Annexes

Research Note: Divergent selection for breast muscle ultimate pH affects egg quality traits in broiler breeders

Kadir Erensoy,[*,†] Emilie Raynaud,[*] Angélique Petit,[*] Yannick Baumard,[‡] Sonia Métayer-Coustard,[*] and Elisabeth Le Bihan-Duval [*,1]

[*]*INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly, France;* [†]*Ondokuz Mayıs University, Agricultural Faculty, Department of Animal Science, 55139 Samsun, Turkey; and* [‡]*INRAE, PEAT, 37380 Nouzilly, France*

ABSTRACT Two divergently selected broiler lines were created by selection for low (**pHu-**) or high (**pHu +**) *Pectoralis major* ultimate pH (**pHu**) in order to better understand the molecularmechanisms underlying meat quality traits in broilers and are also unique genetic resources reflecting low and high glycogen levels in chicken muscle. The present study aimed to reveal the correlated phenotypical changes of egg quality traits in broiler breeders from the 2 divergent lines at the 14th generation. Birds were reared on littered floor system until 18 wk of age and in individual cages up to 42 wk. Individual egg production was recorded daily from age at first egg to 42 wk. External (egg weight: **EW** and shape index: **SI**), internal (albumen height: **AH**, Haugh unit: **HU**, yolk index: **YI**, and yolk color: **YC**), and shell (shell percentage: **ESP**, thickness: **EST** and strength: **ESS**) characteristics of eggs in pHu- and pHu+ lines were measured in all eggs for 4 consecutive days at 26, 27, 28, 30, 31, 32, 41, and 42 wk of age. The pHu- line had significantly higher egg percentage than pHu+ (55.9 and 49.1%, respectively). The EW in pHu- line (57.2 g) was significantly lower than in pHu+ (59.0 g) and increased with age in both lines. The mean ESP, EST and ESS were lower in the pHu+ eggs compared to the pHu- line. ESP and EST decreased mainly from 26 to 27 wk of age and they had a stable trend with advancing age in the remaining weeks. AH and YI were lower in pHu- line eggs than in pHu+. YC was more intense and HU higher in pHu+ eggs than pHu- in pre-peak and peak laying period. In conclusion, these results showed that a divergent selection for muscle energy metabolism has led to correlated responses on internal and external egg quality traits and suggest that the production of good-quality eggs may be impaired in broiler breeders with low energy reserves.

Key words: broiler, egg quality, meat quality, metabolism, muscle glycogen

2022 Poultry Science 101:102142
https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102142

INTRODUCTION

Selection for fast-growth and feed efficiency of broilers has been a major breeding objective for decades due to the high heritability of these traits and positive impact on the overall cost of meat production. It has been shown that advances in body weight, feed efficiency and breast meat yield are mainly achieved through genetic selection and resulted in a decrease in muscle energy reserves (glycolytic potential) resulting in a higher ultimate pH in the breast meat of broilers (Le Bihan-Duval et al., 2020). On the other hand, the increase in growth rate caused some reproductive dysfunctions in broiler breeders such as delayed sexual maturity age, defective egg syndrome, and decreased egg production (Decuypere et al., 2010).

The size, composition and quality of the egg depend on the physiological and maternal fitness of the females. The eggshell consists of ∼98% calcium and is the primary source of calcium for bone development in chicken embryos. Albumen is less dense than egg yolk and contains mostly water (88−90%), while the remainder contains about 10% protein, 1% carbohydrates, and traces of lipids. Egg yolk lipids contribute about 90% of embryonic energy production used formaintenance, body growth, and development (van der Wagt et al., 2020).

Reproductive performance of broiler stocks has declined due to the continuous increase in growth rate, because the genetic merits of the 2 traits are negatively correlated. However, there are no studies investigating the direct effects of variation in muscle energy metabolism on egg production and quality in broiler breeders. Two divergent broiler lines (pHu+ and pHu-) were

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Received October 26, 2021.
Accepted August 19, 2022.

[1]Corresponding author: elisabeth.duval@inrae.fr

created by selection over 14 generations for low or high breast muscle pH (*Pectoralis major* pHu) in order to better understand the physiological and genetic mechanisms of meat quality traits in broiler chickens. These lines are also a unique genetic materials that reflects low and high muscle glycogen levels at early post-hatch (Métayer-Coustard et al., 2021) and 6 wk of age (Alnahhas et al., 2015). This study aimed to reveal the phenotypical changes of internal and external egg quality traits in their breeders.

MATERIALS AND METHODS

The present study was performed in agreement with the French National Regulation for human care and use of animals for research purposes. Animals were reared at the PEAT INRAE Poultry Experimental Facility (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12) registered by the French Ministry of Agriculture under license number C-37-175-1 for animal experimentation (INRAE, Centre Val de Loire, Nouzilly, France).

Animals and Management Procedures

The pHu+ and pHu- lines have been divergently selected over 14 generations for breast meat ultimate pH (**pHu**) measured on 6 wk old broilers. The base population originated from a grand-parental female standard line selected for a balance between growth and reproduction traits. As the measurement of pHu requires sacrificing the birds, selection of breeders was performed on their siblings. On average, 34 male and 80 female breeders were selected as parents of the next generation. The present study was conducted on egg traits collected from 80 hens of the pHu- line and 77 hens of the pHu+ line, at the 14th generation of selection.

Similar procedures were applied for each line in terms of hatching, management, feeding, vaccination, and sanitary practices. To reduce the effects of the environment, birds from the 2 lines were reared together in a standard closed broiler house equipped with a dynamic ventilation system, gas heaters, automatic pan feeders, and nipple drinkers at PEAT INRAE Poultry Experimental Facility. The selection process has been quite efficient since after 14 generations of selection a difference of about 0.66 pH unit was observed between the 2 lines.

For breeders, chickens were reared on the littered floor system until 18 wk of age and transferred to the laying house with individual cages at 18 wk of age and they were kept in this house during later weeks. The first light stimulation was applied at 19 wk of age, so that they could start laying at around23 to 24 wk of age. The birds freely accessed water at all ages. They were fed ad libitum for the first 3 wk and the sameamount of restricted feed was given daily for both lines between 4 and 42 wk of age. From 4 to 34 wk of age, the amount of feed was gradually increased by 4 to 5 g/hen per week and decreased from the 35 wk onwards.

Data Collection

To characterize their reproductive traits, egg production was recorded daily and individually from the age at first egg to 42 weeks at 14th generation. Based on individual daily egg records, egg production (EGGPRO, number of eggs from first egg to 42 wk of age) and egg percentage (EGGPERC, % of eggs from first egg to 42 wk of age) were determined.

Internal and external quality traits of eggs were measured in all eggs for 4 consecutive days at 26, 27, 28, 30, 31, 32, 41, and 42 wk of age. Egg weight (**EW**, in g), eggshell strength (**ESS**, in N), albumen height (**AH**, in mm), Haugh unit (**HU**), and yolk color (**YC**) were measuredwith a digital egg tester (DET6000, Nabel Co., Ltd, Kyoto, Japan). Shape index (**SI**, in %) was defined as the ratio of the length on the width measured to the nearest 0.1 mm with electronic caliper. Egg shells were dried in an oven at 110°C for 2 h after the membranes were cleaned and then egg shell weight (**ESW**, in g) was determined. Egg shell thickness (**EST**, in mm) was measured at around the equatorial region of egg using a dial pipe gauge (Mutitoyo Corp., Kawasaki, Japan). Egg shell percentage (**ESP**, in %) was calculated as egg shell weight / egg weight × 100. HU was determined according to formula: $Haugh\ unit = 100 \times log\ (AH + 7.57 - 1.7\ EW^{0.37})$. Yolk index (YI, in %) was calculated as yolk height divided by yolk diameter.

Statistical Analyses

Data analysis was carried out using XLSTAT (Version-2021.2.1, Addinsoft, Paris, France) statistical software. One-way analysis of variance was used to determine the effects of pHu selection (pHu- and pHu+) on egg percentage (%). The effects of pHuline (pHu- and pHu+), week (26−42 wk of age) and their interaction on egg quality traits (e.g., egg weight, shape index, shell traits, albumen height, Haugh unit, yolk index, and yolk color) were subjected to a 2-way analysis of variance and analyzed with the following ANOVA model:

$$Y_{ijk} = L_i + W_j + LW_{ij} + e_{ijk}$$

with Y_{ijk} being the dependent variable for mean values of eachegg quality traits per hen and week, L_i the fixed effect of line (pHu- andpHu+), W_j the fixedeffect of week (26−42 wk of age), LW_{ij} the interaction between line i and week j, and e_{ijk} the residual for hen k trait. Duncan's multiple range test was used whenthe difference between the means was significant at least at the 0.05 level. Each egg quality data were expressed by the least squares mean and standard error of the means (**SEM**). The values with a $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Weekly egg percentage (EGGPERC) of pHu lines between 23 and 42 wkof age is given in Figure 1A.

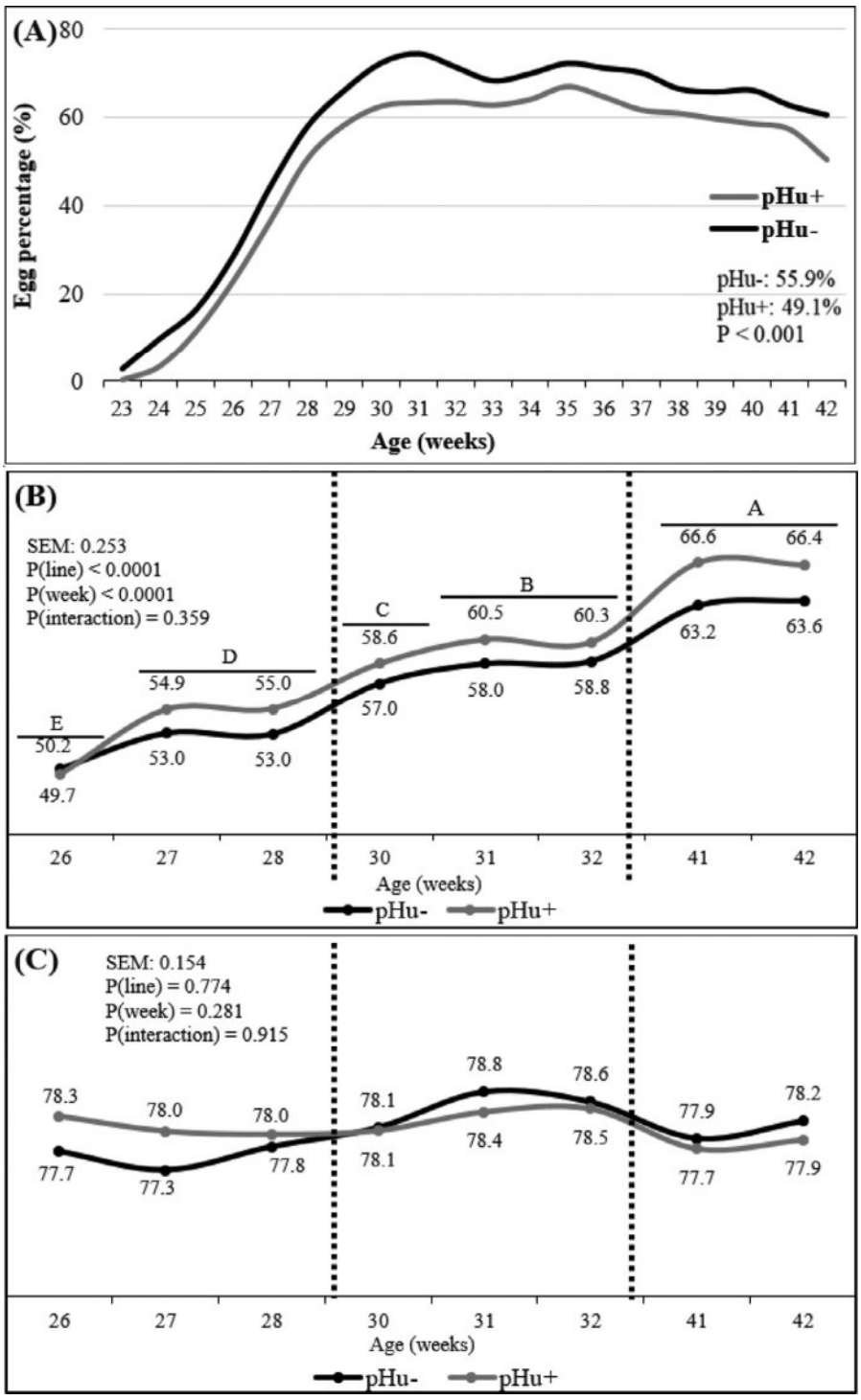


Figure 1. The change of weekly egg percentage (A), egg weight (B) and shape index (C) of pHu lines in 14th generation [1] SEM, Standard error of the means. [1] Data represent least square means for the given traits. Means with different letters indicate significant differences among weeks, $P < 0.05$. Vertical dotted lines indicate the different age periods (pre-peak [26−28 wk], peak [30−32 wk], and post-peak [41−42 wk]).

Average EGGPERC was significantlyhigher in pHu- (55.9%) than pHu+ (49.1%) line ($P < 0.001$). The pHu- line produced more eggs than pHu+ at all ages and the total EGGPRO was 78.3 and68.8 eggs for pHu- and pHu+ line hens, respectively. The overall laying performance of the pHu lines are lower compared to commercial parent stocks with a 42-wk laying percentage of 74 to 77% (compared to 50−60% in the pHu lines) and a cumulative 91 to 92 eggs (Cobb-Vantress, 2020; Aviagen, 2021). However, unlike commercial parents, the pHu lines are pure-bred experimental lines that do not benefit from the heterosis effects arising from cross-breeding. Moreover, their selection focused on only breast meat pHu since 2009, without any weight put on the egg production in the selection index. As the growth characteristics of pHu broilers (over 2.7 kg BW and 20% breast meat yield at 42 d at the 14thgeneration) are close to those of commercial broilers, the divergent lines

are, however, avaluable model to study the tradeoff between energy reserves and egg production in breeders of fast-growing lines.

The EW in pHu- line (57.2 g) was significantly lower than in pHu+ (59.0 g) and increased with age in both lines (Figure 1B). A wide range of changes occur in the internal and external egg quality traits with the advancing breeder age and the age-related increase trend in EW of pHu- and pHu+ hens was similar to the general literature (Nasri et al., 2020). These lower EGGPERC and heavier EW of the pHu+ hens may be related to reduced follicular maturation rate, in line with Johnston and Gous (2007). When EW and EGGPRO are evaluated simultaneously, egg mass is a good measure of productivity andre flects total nutrient output for a hen. The average weekly egg mass between 26 and 42 wk of age was 30.6 and 34.2 g/day for the pHu+ and pHu- line, respectively. In other words, the increase in EW of pHu+ hens with low eggnumber was insuf ficient to compensate for the total nutrient output. The fact that pHu+ line hens had less egg output than pHu- and it takes longer for egg formation clearly shows the inadequacy of the allocatedresources inthe pHu+ line for reproductive functions.

No significant effect of the line nor week was found for SI (Figure 1C), the average index value being 78.1. As for EW, the interaction effect on SI was found nonsignificant. Rajaravindra et al. (2015) also reported that the SI did not change with advancing age in broiler breeders. In our study, SI was similar between the lines for each week; that is, when the average egg length increased by 1 unit, the width increased by 0.78 units for both lines. Although the EW in pHu+ hens was higher than pHu-, this weight difference did not cause a change in the SI. It is obvious that meat quality traits and muscle energy metabolism that change over ultimate pH selection are not related to the SI of eggs, which suggests that these traits are controlled by different mechanisms.

ESP and EST were affected by line and week main effects (Figures 2A and 2B; $P < 0.0001$). The mean ESP was lower in the pHu+ line (8.9%) compared to the pHu-line (9.4%) between 26 and 42 wk and ESP decreased with advancing age. EST was higher in pHu- eggs (0.37 mm) than in pHu+ line (0.35 mm), and the highest values found at 26 wk of age for both lines ($P < 0.0001$). The pHu+ line eggs (34.3 N) had significantly less ESS values than pHu- eggs (36.4 N), irrespective of age. The interaction effect was nonsignificant for the ESP, EST, and ESS traits. Age-related worsening of ESP and EST in both lines were partially found to be compatible with the literature and as a result of aging physiology, the increase inshell weight occurred at a decreasing rate compared to the increase in EW, and the shell became thinner (Nasri et al., 2020). However, the age-related decrease in ESP and EST did not significantly affect the ESS, andalthough there were minor fluctuations, breaking strength was preserved in both pHu lines, whatever week effect.

While AH ($P < 0.0001$) and YI ($P < 0.0001$) were affected only by the line and week main effects, the interaction effect was significant for YC ($P = 0.008$) and HU ($P = 0.036$) traits. AH value was lower in pHu- line eggs (7.4 mm) than in pHu+ (7.8 mm). While AH did not change significantly between 26 and 32 wk of age, it decreased at 41 and 42 wk when it became similar between lines (Figure 2C). In pre-peak and peak laying periods, HU was higher in pHu+ line eggs compared to pHu- eggs. However, this situation changed at 41 and 42 wk since HU decreased with age to reach more similar values in both lines (Figure 2D). AHand HU are interrelated indicators that reflect albumen quality. Since the eggshell and yolk weight of the pHu lines are similar (Petit et al., 2022), the heavier egg weight of the pHu+ line is due to the higher albumen weight. The higher HU and AH in pHu+ eggs at 26 to 32 wk of age were probably due to the higher albumen viscosity, consistent with Zhang et al. (2020). AH and HU are also related to eggshell thickness, conductance, and albumen pH (Nasri et al., 2020). In our study, EST was lower in the pHu+ line, which is consistent with Petit et al.(2022) . Although AH and HU were higher in pHu+ eggs in our study, the albumen pHof pHu lines was found similar in the study of Petit et al. (2022). This suggests the main role of viscosity and a higher concentration of protein anddry matter inthe albumen of pHu+ eggs. Inour study, while HU tended to decrease with advancing age, AH decreased only in the post-peak period. Age-related deterioration inalbumen quality is mainly due to the increase in albumen pH and decrease in viscosity (Nasri et al., 2020). The larger deterioration of both AH and HU at 41 and 42 wk of age in pHu+ eggs compared to pHu- may be partially related to worsening of shell quality in pHu+ eggs. Although pHu+ eggs seem to be better until 41 wk of age in terms of the biological value of albumen and yolk traits, the same may not be the case in terms of embryonic development. Because more viscous albumen prevents gas diffusion and the use of nutrients in the very early stages of embryonic development. This situation seems likely to adversely affect chick yield and quality that need to be further investigated in the pHu lines.

YI values decreased significantly for both lines with age, and the mean YI in pHu- and pHu+ line eggs was determined as 0.43 and 0.45, respectively (Figure 2E). YI is related to vitelline membrane strength, an equally important component of the hatching eggs (Reijrink et al., 2008). In our study, the higher YI in pHu+ eggs at each week of age indicates that they may have a more resistant vitelline membrane. YC tended to increase with age, the highest values being obtained at 41 to 42 wk (Figure 2F). YC was more intense in pHu+ line than pHu- in pre-peak and peak laying period, but at 41 to 42 wk for which YC in the 2 lines reached similar values. The delay of ovulation intervals causes the same amount of yolk obtained from hepatic synthesis to accumulate in fewer follicles (Johnston and Gous, 2007). pHu+ line had ~9.5 eggs/hen less than pHu- line between 23 and 42 wk of age. In this case, it is speculated that the egg yolk synthesized in pHu+ hens accumulates in fewer follicles than pHu- line. Petit et al. (2022) reported that

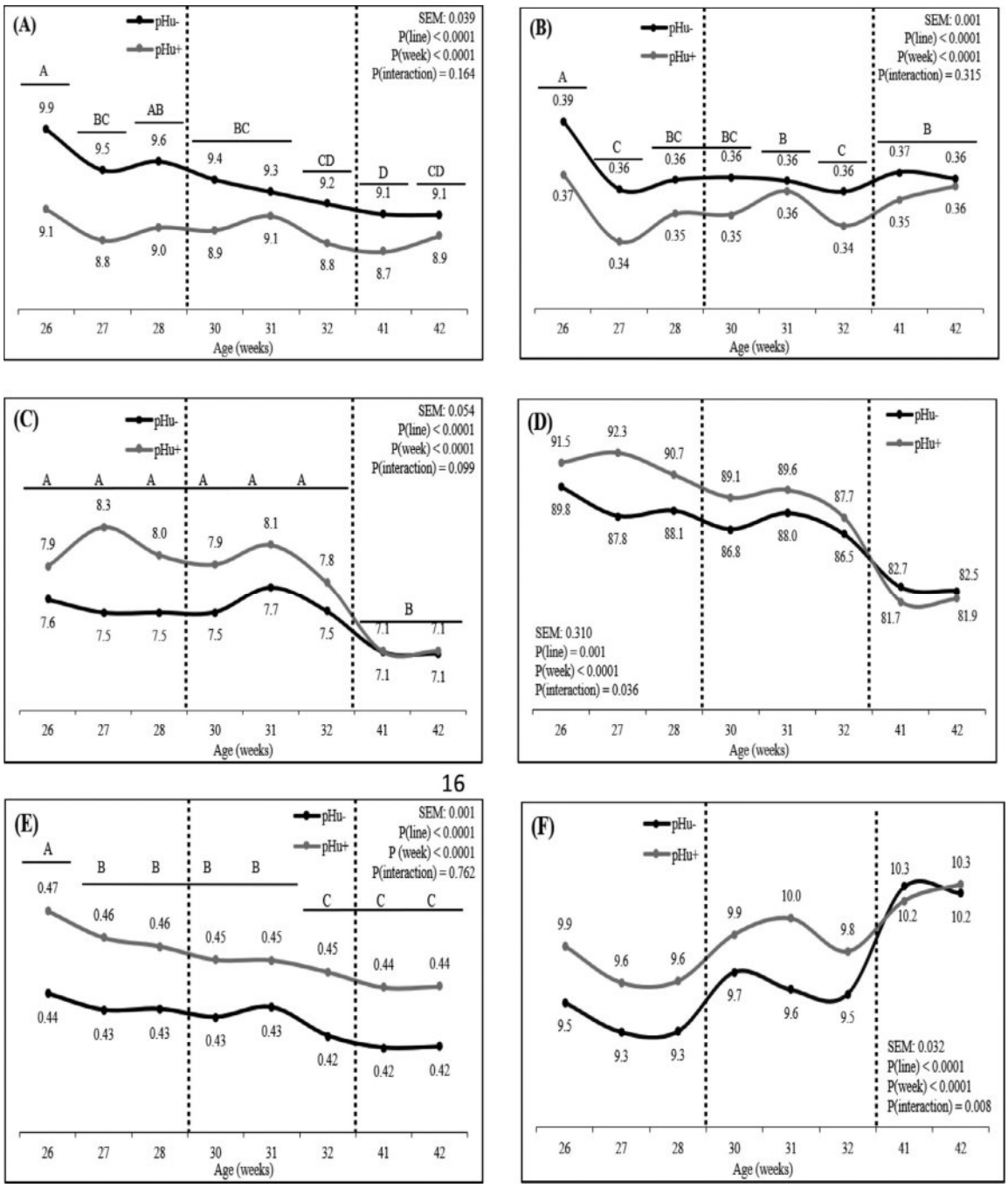


Figure 2. The change of egg shell percentage (A), egg shell thickness (B), albumen height (C), Haugh unit (D), yolk index (E), and yolk color (F) of pHu lines in 14th generation [1] SEM, Standard error of the means. [1] Data represent least square means for the given traits. Means with different letters indicate significant differences among weeks, $P < 0.05$. Vertical dotted lines indicate the different age periods (pre-peak [26−28 wk], peak [30−32 wk], and post-peak [41−42 wk]).

egg yolkof pHu+ hens have higher lipid percentage, largely explaining the more intense yolk color of pHu+ eggs compared to pHu- line. However, at 41 and 42 wk of age, the egg yolk color of pHu- hens increased more rapidly and reached a similar level with pHu+ line. The longer maturity duration of the egg yolk follicles at 41 and 42 wk may have resulted in greater darkening in the yolk color of both lines.

Our study results clearly showed that variation in energy metabolism resulting from the divergent selection onmeat ultimate pH inbroilers phenotypically affects internal and external egg quality traits in their breeders. We got strong indications that the production of eggs for broiler breeders with low muscle energy reserves (pHu+) has become more metabolically costly and that maternal influences on egg quality traits may contribute to some of the early phenotypic differences observed between the 2 lines. In our study on pHu fast-growing lines, we revealed that in addition to growth rate, the metabolic status of the broiler breeders is also an important factor to be considered in optimizing egg production and quality, and this is partly determined by genetics.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by INRAE and an International Research Fellowship Program of the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, Grant No. BIDEB-2214-A).

DISCLOSURES

The authors state that they have no conflicts or competing interests regarding this work.

REFERENCES

Alnahhas, N., E. Le Bihan-Duval, E. Baeza, M. Chabault, P. Chartrin, T. Bordeau, E. Cailleau-Audouin, K. Meteau, and C. Berri. 2015. Impact of divergent selection for ultimate pH of pectoralis major muscle on biochemical, histological, and sensorial attributes of broiler meat. J. Anim. Sci. 93:4524–4531.

Aviagen. 2021. Ross 308 parent stock: performance objectives, https://ap.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_PS/Ross308ParentStockPerformanceObjectives-2021-EN.pdf/ (accessed July 2022).

Cobb-Vantress. 2020. Cobb500 fast feather breeder management supplement, https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/8c46601377/Cobb500-Fast-Feather-Breeder-Management-Supplement.pdf (accessed July 2022).

Decuypere, E., V. Bruggeman, N. Everaert, Y. Li, R. Boonen, J. De Tavernier, S. Janssens, and N. Buys. 2010. The broiler breeder paradox: ethical, genetic and physiological perspectives, and suggestions for solutions. Br. Poult. Sci. 51:569–579.

Johnston, S. A., and R. M. Gous. 2007. Modelling the changes in the proportions of the egg components during a laying cycle. Br. Poult. Sci. 48:347–353.

Le Bihan-Duval, E., N. Alnahhas, E. Pampouille, C. Berri, and B. Abasht. 2020. Genetics and genomics of meat quality traits in poultry species. Pages 127−150 in Advances in Poultry Genetics and Genomics. S. E. Aggrey, H. Zhou, M. Tixier-Boichard and D. D. Rhoads, eds. Burleigh Dodds Series in Agricultural Sciences, Cambridge, UK.

Métayer-Coustard, S., S. Tesseraud, C. Praud, D. Royer, T. Bordeau, E. Coudert, E. Cailleau-Audouin, E. Godet, J. Delaveau, E. Le Bihan-Duval, and C. Berri. 2021. Early growth and protein-energy metabolism inchickenlines divergently selected onultimate pH. Front. Physiol. 12:144.

Nasri, H., H. van den Brand, T. Najjar, and M. Bouzouaia. 2020. Egg storage and breeder age impact on egg quality and embryo development. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 104:257–268.

Petit, A., S. Réhault-Godbert, L. Nadal-Desbarats, E. Cailleau-Audouin,P. Chartrin, E. Raynaud, J. Jimenez, S. Tesseraud, C. Berri, E. Le Bihan-Duval, and S. Métayer-Coustard. 2022. Nutrient sources differ in the fertilised eggs of two divergent broiler lines selected for meat ultimate pH. Sci. Rep. 12:5533.

Rajaravindra, K. S., U. Rajkumar, K. Rekha, M. Niranjan, B. L. N. Reddy, andR. N. Chatterjee. 2015. Evaluation of egg quality traits in a synthetic coloured broiler female line. J. Appl. Poult. Res. 43:10–14.

Reijrink, I. A. M., R. Meijerhof, B. Kemp, and H. van Den Brand. 2008. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. Worlds Poult. Sci. J. 64:581–598.

van der Wagt, I., I. C. de Jong, M. A. Mitchell, R. Molenaar, and H. van den Brand. 2020. A review on yolk sac utilization in poultry. Poult. Sci. 99:2162–2175.

Zhang, J., M. Zhang, W. Liang, Z. Geng, and X. Chen. 2020. Green tea powder supplementation increased viscosity and decreased lysozyme activity of egg white during storage of eggs from Huainan partridge chicken. Ital. J. Anim. Sci. 19: 586–592.

frontiers in Animal Science

PERSPECTIVE
published: 04 January 2022
doi: 10.3389/fanim.2021.755842

Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition: A Mini-Review

Charlotte Andrieux[1†], *Angélique Petit*[2†], *Anne Collin*[2], *Marianne Houssier*[1], *Sonia Métayer-Coustard*[2], *Stéphane Panserat*[1], *Frédérique Pitel*[3] and *Vincent Coustham*[1,2*]

[1] INRAE, Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France, [2] INRAE, Université de Tours, BOA, Nouzilly, France, [3] INRAE, Université de Toulouse, ENVT, GenPhySE, Castanet-Tolosan, France

Early development is a critical period during which environmental influences can have a significant impact on the health, welfare, robustness and performance of livestock. In oviparous vertebrates, such as birds, embryonic development takes place entirely in the egg. This allows the effects of environmental cues to be studied directly on the developing embryo. Interestingly, beneficial effects have been identified in several studies, leading to innovative procedures to improve the phenotype of the animals in the long term. In this review, we discuss the effects of early temperature and dietary programming strategies that both show promising results, as well as their potential transgenerational effects. The timing, duration and intensity of these procedures are critical to ensure that they produce beneficial effects without affecting animal survival or final product quality. For example, cyclic increases in egg incubation temperature have been shown to improve temperature tolerance and promote muscular growth in chickens or fatty liver production in mule ducks. *In ovo* feeding has also been successfully used to enhance digestive tract maturation, optimize chick development and growth, and thus obtain higher quality chicks. In addition, changes in the nutritional availability of methyl donors, for example, was shown to influence offspring phenotype. The molecular mechanisms behind early phenotype programming are still under investigation and are probably epigenetic in nature as shown by recent work in chickens.

Keywords: programming, bird, temperature, nutrition, *in ovo*, embryo

OPEN ACCESS

Edited by:
Pascale Chavatte-Palmer, INRA UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, France

Reviewed by:
Dana L. M. Campbell, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Australia
Christi Swaggerty, United States Department of Agriculture (USDA), United States

***Correspondence:**
Vincent Coustham
vincent.coustham@inrae.fr

[†] These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Animal Physiology and Management, a section of the journal Frontiers in Animal Science

Received: *09 August 2021*
Accepted: *14 December 2021*
Published: *04 January 2022*

Citation:
Andrieux C, Petit A, Collin A, Houssier M, Métayer-Coustard S, Panserat S, Pitel F and Coustham V (2022) Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition: A Mini-Review. Front. Anim. Sci. 2:755842. doi: 10.3389/fanim.2021.755842

INTRODUCTION

Early development is a critical period during which the environment influences the health, welfare, robustness and performance of livestock (Ho et al., 2011; Reed and Clark, 2011). Long-term effects of the early environment, i.e., during embryogenesis or the first days of life, have been demonstrated in cattle (Reynolds and Vonnahme, 2017), sheep (Reynolds et al., 2010), pigs (Feeney et al., 2014), fish (Panserat et al., 2019), and birds (Feeney et al., 2014; Loyau et al., 2015) among others. The oviparous vertebrate model differs from the others due to an embryonic development outside of the dam. Therefore, the embryo can be easily manipulated, opening up new opportunities for phenotypic programming to improve poultry production.

Embryonic incubation conditions have been studied since the mid-20th century to find optimal incubation parameters for poultry production. The concept of programming has emerged more

recently with the demonstration of beneficial effects of different stimuli such as temperature (Loyau et al., 2015), nutrition (Uni et al., 2005; Cherian, 2011) or changes in maternal diet (Hynd et al., 2016; Baéza et al., 2017). The purpose of this review is to provide a concise description of the advancement of this concept in four poultry species (broiler chickens, quails, ducks and turkeys) with a particular interest on two main embryonic programming strategies, nutrition and temperature.

NUTRITIONAL PROGRAMMING STRATEGIES

The Maternal Nutrition as a Lever to Program the Progeny's Phenotype

Several maternal nutritional strategies have been developed to modulate egg nutrient content to obtain higher quality chicks in terms of robustness, growth and bodycomposition. The links between hen nutrition and management, egg composition and subsequent animal behavior, performance, and disease susceptibility are well-established (Aigueperse et al., 2013). The breeder hen's diet can modulate the levels of other essential nutrients, which in turn can impact the fitness of hatched chicks and their phenotype later in life (for reviews, see Rühl, 2007; Morisson et al., 2017).

Fatty acids are essential for embryonic development, bird growth, the development of the central nervous system and the immune system (Noble et al., 1984; Dingand Lilburn, 1996; Wang et al., 2004; Cherian, 2015; Koppenol et al., 2015; Thanabalan and Kiarie, 2021). The balance of fatty acids (FA) can be modulated via the hen's diet. Ducklings from ducks fed witha FA ω3-enriched diet have a higher live weight at hatch (D0), D28 and D56 and a lower feed conversion ratio for the growing period (Baéza et al., 2017). Reduced hyperactivity and stress responsiveness in ducklings were also observed. Supplementation with FA ω3 LC also reduced the frequency and severity of pecking in ducklings.

In low protein feeding programs, not only are egg-laying rate and egg weight altered, but also the amount of leptin in the yolk sac and the expression of a number of genes in the yolk sac, hypothalamus, or muscle of the offspring (Rao et al., 2009). The chicks have lower hatch weight but faster post-hatch growth. More recently, it has been shown that feeding broiler breeders reduced protein diets has a negative impact on reproductive performance but improved offspring performance (Lesuisse et al., 2017), even in subsequent generations (Lesuisse et al., 2017, 2018). Studies testing different levels of digestible lysine (CiacciarielloandTyler, 2013) or arginine (Fernandes et al., 2014) in hen diets have shown positive effects on offspring such as performance improvement, carcass yield, abdominal fat content, and bone quality for arginine supplementation.

Mineral and vitamin supplementations have often been studied to solve defects of mineralization of the skeleton and legs problems. Vitamins can be enriched in the egg through the hen's diet. Vitamin A is produced by the hen from the carotenoids in the feed. They have antioxidant properties, which are essential for the embryo. Indeed, in the last stage of incubation, fatty acid oxidation increases, as does the production of free radicals and oxidative stress. These processes mainly cause damage to the embryos (Surai et al., 2016). Vitamin D3 regulates the flow of calcium through the chorioallantoic membrane. A vitamin D-deficient diet leads to decreased Ca^{++} transport across the chorioallantoic membrane and decreased Ca^{++} accumulation inthe embryo, as well as increased late embryonic mortality (malposition, beak unable to break through the shell). Minerals such as iodine, selenium, magnesium, zinc, copper, iron or manganese can also be enriched in eggs (Jiakui and Xiaolong, 2004; Chinrasri et al., 2013; Favero et al., 2013; Saunders-Blades and Korver, 2015; Torres and Korver, 2018; Xie et al., 2019).

Overall, maternal feeding approaches optimize the hen's diet through supplementation or restriction of a wide variety of nutrients. However, it is often difficult to assess whether the effects of maternal diet on offspring are direct or not.

In ovo Nutrition Programming Strategies

In ovo feeding is amore direct wayto influence offspring phenotype. Several studies have reported the use of *in ovo* nutrient supplementation to reduce thehatch window and improve health, post-hatch immune status, hatchability, hatched chick weight, growth performance, and meat quality (Uni and Ferket, 2004; Wei et al., 2011; Kadam et al., 2013; Roto et al., 2016; Gao et al., 2017; Peebles, 2018; Taha-Abdelaziz et al., 2018; Jha et al., 2019; Kalantar et al., 2019; Ayansola et al., 2021). New *in ovo* strategies also aim to address new challenges such as finding alternatives to antibiotic use through probiotic injections (Oladokun and Adewole, 2020). Therefore, *in ovo* stimulation of chicken microflora offers a better approach in establishing intestinal microflora (Alagawany et al., 2021).

At hatching, chicks switch from a yolk FA-based diet to a complete diet. Injection of carbohydrates and amino acids (AA) during embryonic development allows chicks to adapt to their post-hatch diet. Carbohydrates are widely studied because their concentration within the egg is less than one percent of total nutrients (Campos et al., 2011). To limit the utilization of FA and proteolysis of muscle proteins for energy purposes, injections of carbohydrates alone or combined with other nutrients of interest have been performed *in ovo* to increase glycogen storage and modulate energy status of chicks (Retes et al., 2017). Results depended on the type of sugar injected, injection site, embryo developmental stage, and genetics. Smirnov et al. (2006) showed an effect of carbohydrate injection on intestinal epithelium development with a 27% increase in villus area at hatching.

Amino acid administration improves hatching weight (Ohta et al., 2001) which persists up to 56 days of age in some studies (Al-Murrani, 1982). *In ovo* injection of AA such as arginine, considered an essential amino acid in birds, has been used to improve post-hatch growth performance via regulation of protein synthesis through the mTOR pathway (Yu et al., 2018). Arginine also stimulated myogenin gene expression in cultured chicken tissues (Li et al., 2016b). Moreover, *in ovo* injection of sulfur AA (methionine plus cysteine) resulted in improved embryonic development, IGF-I and TLR4 gene expression, antioxidant status and jejunum histomorphometry of newly

hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation (Elnesr et al., 2019; Elwan et al., 2019).

In ovo injection of AA, FA, vitamins, and trace elements on early post-hatch growth may also impact the development of lymphoid organs (thymus, bursa, and spleen) and immune parameters in broilers (Bakyaraj et al., 2012). *In ovo* vitamin and mineral administration significantly augmented the hatchability percentage and body weight of chicks post hatching (Alagawany et al., 2020; Hassan et al., 2021). The efficacy of vitamins C, E, D3, and folic acid on embryonic health and development has been reported in the literature (Peebles, 2018). The use of the yolk by the embryo for energy purposes results in oxidative processes, leading to the degradation of polyunsaturated fatty acids in cell membranes. Vitamins, such as vitamin E or C, protect the embryo by limiting the negative effects of free radicals (Surai et al., 2016; Araújo et al., 2018; Peebles, 2018). Results may depend on doses, ages, and injection sites.

Determining the mechanisms by which egg nutrients regulate cellular metabolism, signaling, gene expression and function is critical toimproving nutrient utilization, poultry production efficiency and animal robustness. In birds, most studies only report phenotypic results of *in ovo* injections. Only a few recent studies are beginning to decipher the mechanisms involved in these phenotypic changes. Epigenetic changes may be involved, especially when methyl group donors, such as methionine, are injected (Anderson et al., 2012; Donohoe and Bultman, 2012; Veron et al., 2018). Thus, manipulation of sulfur AA content can induce changes in cellular function that may have implications for the development, long-term growth, and health of the animal. The early utilization of nutrients like AAcan influence disease resistance and embryo survival (Saeed et al., 2019). Folate supplementation improved growth performance, immune function, and folate metabolism of broilers through epigenetic regulation of immune genes by altering chromatin conformation and epigenetic marks such as histone methylation (Li et al., 2016a). Injection of betaine (a component of the methionine cycle), also considered an effective antioxidant agent and methyl donor, affects hepatic cholesterol metabolism through epigenetic gene regulation in newly hatched chicks (Hu et al., 2015).

TEMPERATURE PROGRAMMING STRATEGIES

Temperature Increases During Egg Incubation

Thermal manipulation (TM) during embryogenesis has been studied for over three decades. TM involves altering egg incubation temperature to improve post-hatch physiological responses of birds (Iqbal et al., 1990). In particular, fine-tuning egg incubation temperature has been used to develop strategies to help chickens better withstand heat later in life (Loyau et al., 2015). TM has since been studied in several other avian species, including turkeys for thermoregulation and muscle growth (Maltby et al., 2004; Piestun et al., 2015), ducks for the lipid metabolism and liver (Wang et al., 2014; Massimino et al., 2019), and quail for growth, physiological and metabolic parameters (Vitorino Carvalho et al., 2020).

Cyclic increases in incubation temperature, mimicking naturally fluctuating conditions, have been found to improve thermal tolerance while minimizing hatching defects (Piestun et al., 2008; Loyau et al., 2015). Because of the interference between the thermoregulatory system and other body functions, TM has also been shown to alter a broader range of phenotypes. For instance, TM has been shown to affect growth in broiler chickens and quails (Loyau et al., 2013; Vitorino Carvalho et al., 2020), muscle development in broiler chickens (Collin et al., 2007; Piestun et al., 2009), skin vascularization in broiler chickens (Morita et al., 2016) and immunity in Pekin ducks (Shanmugasundaram et al., 2018). In Pekin ducks, TM positively impacted muscle fiber diameter and regulatory pathways of muscle development (Liu et al., 2015; Li et al., 2017). Interestingly, TM increased liver weight (Liu et al., 2015) and lipogenesis gene activity in Pekin ducks (Wang et al., 2014). Three different TM conditions were shown to result in increased fatty liver weight, lipid amount, and droplets size after the overfeeding period in mule ducks (Massimino et al., 2019).

Several factors must be considered when implementing a thermal incubation strategy, the most important being the timing and the cyclicality of the treatment and the level of temperature increase (Loyau et al., 2015). For example, early days of embryogenesis and continuous temperature increases should be avoided, as they are associated with hatching defects (Massimino et al., 2019; Vitorino Carvalho et al., 2020). Breeding age and genetics contribute to the effectiveness of TM (Yalçin et al., 2005). Increasing the relative humidity in the incubator is another important parameter to prevent dehydration during temperature elevation (Loyau et al., 2015). Therefore, incubation parameters must be finely tuned to tip the balance toward positive rather than negative effects. This may explain why this seemingly straightforward procedure is not yet widely used in hatcheries.

One way to refine practices is to understand the mechanisms underlying the effects of TM. With advances in next-generation sequencing, genome-wide gene expression and epigenetic data have shed the light on some central and peripheral molecular effects of TM. In 35-day-old chickens and quails, TM has been shown to have a limited effect on gene expression in muscle and hypothalamus under normal rearing conditions (Loyau et al., 2016; Vitorino Carvalho et al., 2021). However, when animals were subjected to heat exposure at the same age, a much stronger gene expression response was found in the TM group compared to the control group. This may be explained by the involvement of epigenetic marks that are imprinted during the embryonic heat exposure and may trigger a differential response when the animals are again exposed to heat. This hypothesis is supported by the identification of several hundred differential peaks of histone marks altered by TM in the hypothalamus of 35-day-old chickens (David et al., 2019). In ducks, TM has been shown to affect the gene expression level of methylation enzymes (Yan et al., 2015), suggesting that incubation temperature may influence DNA methylation in ducks during early development. In addition, several studies have shown the involvement of heat shock proteins (HSP) and factors (HSF) that protect cells from

deleterious effects of stress such as misfolding and apoptosis (Costa et al., 2020). Interestingly, a recent study showed that TM altered the basal expression of HSP108, HSP90, HSF-1 and HSF-2 during late embryogenesis and the first week of life, but also the mRNA expression dynamics of these HSPs and HSFs during heat stress (Al-Zghoul and El-Bahr, 2019). HSPs were also identified as differentially expressed in genome-wide studies (Loyau et al., 2016; Vitorino Carvalho et al., 2021) but did not appear to be altered at the epigenetic level (David et al., 2019), suggesting that other mechanisms may be involved in TM lifelong memory.

Temperature Decreases During the Egg Incubation

Exposure of eggs to low incubation temperatures has several impacts on chick physiology, but also on long-term health and welfare traits. The young broiler chick is particularly sensitive to coldafter hatching (Collin et al., 2003), andlater in life, fast-growing broilers placed in a cold environment may develop an accumulation of fluid in the peritoneal cavity called ascites (Decuypere et al., 2000). While continuous incubation of eggs at low temperatures below 36°C results in degraded hatchability and increased pre-hatch incubation time (Kühn et al., 1982; Black and Burggren, 2004a,b), fine decreases in incubation temperatures have been proposed to stimulate subsequent cold tolerance in birds (Nichelmann and Tzschentke, 2002; Shinder et al., 2009; Akşit et al., 2013). Exposure to cold at the end of incubation did not alter hatchability but resulted in an increase in internal temperature at 3 days of age compared to control broilers chicks. This improved performance with a 5–10% increase in body weight at 14 and 35 days of age in standard temperature rearing (Shinder et al., 2011) and a 4% increase in female weight at 40 days of age, whereas no such change was observed in males (Nyuiadzi et al., 2020). The authors demonstrated beneficial effects of embryonic thermal programming on broiler health, with 19 and 26% reductions in mortality and incidence of ascites, respectively, compared to control chickens under ascites-inducing conditions. Less intense but cyclic cold embryonic thermal programming decreased mortality and ascites incidence during growth of chicks from old breeders (Shinder et al., 2011). Such treatment induced an increase in body weight but a degradation in feed efficiency and a better cold tolerance of broilers when subsequently subjected to cold (Akşit et al., 2013). Loyau et al. (2014) reported that at hatching, the same embryonic cold exposure conditions resulted in a 9-fold increase in catalase activityin the liver of treated chicks compared to controls. This suggests that cyclic embryonic cold exposure stimulated antioxidant defenses in chicks, presumably in response to a transient increase in cold-induced tissue oxidation risk during incubation (Mujahid and Furuse, 2009).

These medium- to long-term effects of short cold exposures during incubation have been shown to trigger heat production through modifications in thermoregulatory mechanisms via a change in neuronal receptors sensitivity in the hypothalamus (Nichelmann and Tzschentke, 2002), and an increase in plasma triiodothyronine T3 concentration (Kamanli et al., 2015). Finally, the impacts of cold exposure during incubation on subsequent chick behavior were reported by Bertin et al. (2018). The authors analyzed the effect of acute decreases intemperature during days 12–19 of incubation on the expression of fear-related behaviors in broilers. At hatching, this treatment affected neurodevelopmental plasticity in the brain with higher expression of corticotropin-releasing factor in nuclei of the amygdala, altering the chicks' social behavior, novelty perception, and increasingtheir fear behavior. However, cold exposures during incubation under these conditions impaired the health and welfare of chickens reared in postnatal cold (Nyuiadzi et al., 2020).

TRANSGENERATIONAL PROGRAMMING

A growing number of studies have suggested that environmental exposures may be transmitted beyond exposed generations via "transgenerational epigenetic inheritance" (Jablonka and Raz, 2009). Non-genetic transgenerational inheritance has recently been shown to occurin birds (Brun et al., 2015; Leroux et al., 2017). For instance, Brun et al. (2015) showed that the Muscovy duck diet is capable of affecting traits related to growth and lipid metabolism in the grand-offspring, via the sire. In quail, *in ovo* injection of genistein, a phytoestrogen, impacted reproductive and behavioral traits after 3 generations without further injection (Leroux et al., 2017). In a 3-generation study inbroilers, a reducedbalanced proteindiet induced transgenerational effects, including feather condition, polydipsia and frustration-related behavior (Buyse et al., 2020).

While these examples illustrate the existence of non-genetic inheritance of embryonic exposure in birds, the magnitude of these effects remains to be assessed in most cases. Although "epigenetic heritability" has been estimated at very low values for several egg quality traits in meat-type quails (Paiva et al., 2018b), an epigenetic heritability of 0.10 for the weight at 7 days of age has been reported (Paiva et al., 2018a). Concurrently, very little is known about the molecular mechanisms involved, especially in poultry (Guerrero-Bosagna et al., 2018). These may include alterations in sperm miRNAs and lncRNAs (Wu et al., 2019), or putative RNA modifications, DNA methylation, and retained histones (Matsushima et al., 2019).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

To face future challenges, including fluctuations due to climate change and changing farming systems, breeders are under pressure to increase performance and productivity, but also to ensure resilienceand reduce resourceuseand environmental impact. In this context, epigenetic programming is an underestimated lever, as maternal or embryonic nutritional and thermal programming offers promising prospects to improve poultry performance and welfare. Programming the environment of animals (e.g., optimizing theway they are housed and fed) can indeed promote non-genetic factors that may be passed on the subsequentgenerations. This aspect is particularly important in the poultry industry where,

generally, production farms arelocated all over theworld, including in warm climate regions, while breeding farms are concentrated in a few temperate locations. Identifying environmental changes in ancestors that affect offspring traitsthrough the transmission of epigenetic marks would therefore allow breeders to produce commercial animals better adapted to local production environments. In order to implement such fine-tuned practices in the field, additional research is needed in this challenging area to account for the potential variability of breeders and the response of their offspring.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because this review cites approved studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the writing of the review.

FUNDING

CA was funded by the Comité Départemental des Landes (CD40), France. AP was funded by the University of Tours, France. Some results on which this review is based on were part of studies funded by INRAE (Department Animal Physiology and Livestock Systems, Eval_Adapt project) and carried out within the UMT framework Integrative Biology Research and Development (BIRD) associating ITAVI and INRAE, by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), Programs ANR-09-JCJC-0015-01 THERMOCHICK, ANR-09-GENM-004 EPIBIRD and ANR-15-CE02-0009-01 QuailHeatE, and by the Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras (CIFOG).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mireille Morisson (UMR GenPhySE, Toulouse, France) for initial discussions on the review.

REFERENCES

Aigueperse, N., Calandreau, L., and Bertin, A. (2013). Maternal diet influences offspring feeding behavior and fearfulness in the precocial chicken. *PLoS ONE* 8:e77583. doi: 10.1371/journal.pone.0077583

Akşit, M., Yalçin, S., Siegel, P. B., Yenisey, Ç., Özdemir, D., and Özkan, S. (2013). Broilers respond to cooler ambient temperatures after temperature acclimation during incubation and early postnatal age. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 298–307. doi: 10.3382/japr.2012-00675

Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., Abd El-Hack, M. E., Barkat, R. A., Gabr, A. A., et al. (2021). Potential role of important nutraceuticals in poultry performance and health - A comprehensive review. *Res. Vet. Sci.* 137, 9–29. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.04.009

Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Karthik, K., et al. (2020). Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health–a comprehensive review. *Vet. Q.* 41, 1–29. doi: 10.1080/01652176.2020.1857887

Al-Murrani, W. K. (1982). Effect of injectingamino acids into the eggon embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. *Br. Poult. Sci.* 23, 171–174. doi: 10.1080/00071688208447943

Al-Zghoul, M. B., and El-Bahr, S. M. (2019). Basal and dynamics mRNA expression of muscular HSP108, HSP90, HSF-1and HSF-2 in thermally manipulated broilers during embryogenesis. *BMC Vet. Res.* 15:83. doi: 10.1186/s12917-019-1827-7

Anderson, O. S., Sant, K. E., and Dolinoy, D. C. (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J. Nutr. Biochem.* 23, 853–859. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.003

Araújo, I. C. S., Caf,é, M. B., Noleto, R. A., Martins, J. M. S., Ulhoa, C. J., Guareshi, G. C., et al. (2018). Effect of vitamin Ein ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. *Poult. Sci.* 98, 3652–3661. doi: 10.3382/ps/pey439

Ayansola, H., Liao, C., Dong, Y., Yu, X., Zhang, B., and Wang, B. (2021). Prospect of early vascular tone and satellite cell modulations on white striping muscle myopathy. *Poult. Sci.* 100:100945. doi: 10.1016/j.psj.2020.12.042

Baéza, E., Chartrin, P., Bordeau, T., Lessire, M., Thoby, J. M., Gigaud, V., et al. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids provided during embryonic development improve the growth performance and welfare of Muscovy ducks (Cairina moschata). *Poult. Sci.* 96, 3176–3187. doi: 10.3382/ps/pex147

Bakyaraj, S., Bhanja, S. K., Majumdar, S., and Dash, B. (2012). Modulation of post-hatch growth and immunity through in ovo supplemented nutrients in broiler chickens. *J. Sci. Food Agric.* 92, 313–320. doi: 10.1002/jsfa.4577

Bertin, A., Calandreau, L., Meurisse, M., Georgelin, M., Palme, R., Lumineau, S., et al. (2018). Incubation temperature affects the expression of young precocial birds' fear-related behaviours and neuroendocrine correlates. *Sci. Rep.* 8, 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-20319-y

Black, J. L., and Burggren, W. W. (2004a). Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (Gallus domesticus) I. Developmental effects and chronic and acute metabolic adjustments. *J. Exp. Biol.* 207, 1543–1552. doi: 10.1242/jeb.00909

Black, J. L., and Burggren, W. W. (2004b). Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (Gallus domesticus) II. Hematology and blood O2 transport. *J. Exp. Biol.* 207, 1553–1561. doi: 10.1242/jeb.00910

Brun, J. M., Bernadet, M. D., Cornuez, A., Leroux, S., Bodin, L., Basso, B., et al. (2015). Influenceof grand-mother diet on offspring performances through the male line in Muscovy duck. *BMC Genet.* 16, 1–11. doi: 10.1186/s12863-015-0303-z

Buyse, J., Collin, A., Coustham, V., De Haas, E., and Pitel, F. (2020). The use of epigenetics in poultry breeding. *Adv. Poult. Genet. Genomics.* doi: 10.19103/AS.2020.0065.28

Campos, A. M., de, A., Rostagno, H. S., Gomes, P. C., da Silva, E. A., Albino, L. F. T., et al. (2011). Efeito da inoculação de soluções nutritivas *in ovo* sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.* 40, 1712–1717. doi: 10.1590/S1516-35982011000800013

Cherian, G. (2011). Essential fatty acids and early life programming in meat-type birds. *Worlds. Poult. Sci. J.* 67, 599–614. doi: 10.1017/S0043933911000705

Cherian, G. (2015). Nutrition and metabolism in poultry: Role of lipids in early diet. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:28. doi: 10.1186/s40104-015-0029-9

Chinrasri, O., Chantiratikul, P., Maneetong, S., Chookhampaeng, S., and Chantiratikul, A. (2013). Productivity and selenium concentrations in egg and tissue of laying quails fed selenium from hydroponically produced selenium-enriched kale sprout (Brassica oleracea var. alboglabra L.). *Biol. Trace Elem. Res.* 155, 381–386. doi: 10.1007/s12011-013-9824-3

Ciacciariello, M., and Tyler, N. C. (2013). The effects of maternal dietary lysine intake on offspring performance to 21 days of age. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 238–244. doi: 10.3382/japr.2012-00625

Collin, A., Berri, C., Tesseraud, S., RequenaRodón, F. E., Skiba-Cassy, S., Crochet, S., et al. (2007). Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86, 795–800. doi: 10.1093/ps/86.5.795

Collin, A., Buyse, J., Van As, P., Darras, V. M., Malheiros, R. D., Moraes, V. M. B., et al. (2003). Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 70–77. doi: 10.1016/S0016-6480(02)00571-3

Costa, B. T. A., Lopes, T. S. B., Mesquita, M. A., Lara, L. J. C., and Araújo, I. C. S. (2020). Thermal manipulations of birds during embryogenesis. *Worlds. Poult. Sci. J.* 76, 843–851. doi: 10.1080/00439339.2020.1823302

David, S. A., VitorinoCarvalho, A., Gimonnet, C., Brionne, A., Hennequet-Antier, C., Piégu, B., et al. (2019). Thermal manipulation during embryogenesis impacts H3K4me3 and H3K27me3 histone marks in chicken hypothalamus. *Front. Genet.* 10, 1–11. doi: 10.3389/fgene.2019.01207

Decuypere, E., Buyse, J., and Buys, N. (2000). Ascites in broiler chickens: exogenous and endogenous structural and functional causal factors. *Worlds. Poult. Sci. J.* 56, 374–377. doi: 10.1079/WPS20000025

Ding, S. T., and Lilburn, M. S. (1996). Characterization of changes in yolk sac and liver lipids during embryonic and early posthatch development of turkey poults. *Poult. Sci.* 75, 478–483. doi: 10.3382/ps.0750478

Donohoe, D. R., and Bultman, S. J. (2012). Metaboloepigenetics: Interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J. Cell. Physiol.* 227, 3169–3177. doi: 10.1002/jcp.24054

Elnesr, S. S., Elwan, H. A. M., Xu, Q. Q., Xie, C., Dong, X. Y., and Zou, X. T. (2019). Effects of in ovo injection of sulfur-containing amino acids on heat shock protein 70, corticosterone hormone, antioxidant indices, and lipid profile of newly hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation. *Poult. Sci.* 98, 2290–2298. doi: 10.3382/ps/pey609

Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., Xu, Q., Xie, C., Dong, X., and Zou, X. (2019). Effects of in ovo methionine-cysteine injection on embryonic development, antioxidant status, IGF-I and TLR4 gene expression, and jejunum histomorphometry in newly hatchedbroiler chicks exposedto heat stress during incubation. *Animals* 9, 1–13. doi: 10.3390/ani9010025

Favero, A., Vieira, S. L., Angel, C. R., Bess, F., Cemin, H. S., and Ward, T. L. (2013). Reproductive performance of Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 80–91. doi: 10.3382/japr.2012-00607

Feeney, A., Nilsson, E., and Skinner, M. K. (2014). Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 1–7. doi: 10.1186/2049-1891-5-48

Fernandes, J. I. M., Murakami, A. E., de Souza, L. M. G., Ospina-Rojas, I. C., and Rossi, R. M. (2014). Effect of arginine supplementationof broiler breeder hens on progeny performance. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 313–321. doi: 10.4141/cjas2013-067

Gao, T., Zhao, M., Zhang, L., Li, J., Yu, L., Lv, P., et al. (2017). Effect of in ovo feeding of l-arginine on the hatchability, growth performance, gastrointestinal hormones, and jejunal digestive and absorptive capacity of posthatch broilers. *J. Anim. Sci.* 95, 3079–3092. doi: 10.2527/jas.2016.0465

Guerrero-Bosagna, C., Morisson, M., Liaubet, L., Rodenburg, T. B., de Haas, E. N., Koštál, L., et al. (2018). Transgenerational epigenetic inheritance in birds. *Environ. Epigenetics* 4, 0–8. doi: 10.1093/eep/dvy008

Hassan, H. A., Arafat, A. R., Farroh, K. Y., Bahnas, M. S., El-wardany, I., and Elnesr, S. S. (2021). Effect of in ovo copper injection on body weight, immune response, blood biochemistry and carcass traits of broiler chicks at 35 days of age. *Anim. Biotechnol.* 1–8. doi: 10.1080/10495398.2021.1874964

Ho, D. H., Reed, W. L., and Burggren, W. W. (2011). Egg yolk environment differentially influences physiological and morphological development of broiler and layer chicken embryos. *J. Exp. Biol.* 214, 619–628. doi: 10.1242/jeb.046714

Hu, Y., Sun, Q., Li, X., Wang, M., Cai, D., Li, X., et al. (2015). In ovo injection of betaine affects hepatic cholesterol metabolism through epigenetic gene regulation in newly hatched chicks. *PLoS ONE* 10:e0122643. doi: 10.1371/journal.pone.0122643

Hynd, P. I., Weaver, S., Edwards, N. M., Heberle, N. D., and Bowling, M. (2016). Developmental programming : a new frontier for the poultry industry? *Anim. Prod. Sci.* 56, 1233–1238. doi: 10.1071/AN15373

Iqbal, A., Decuypere, E., Abd El Azim, A., and Kühn, E. R. (1990). Pre- and post-hatch high temperatureexposure affects the thyroid hormones and corticosterone response to acute heat stress in growing chicken (Gallus domesticus). *J. Therm. Biol.* 15, 149–153. doi: 10.1016/0306-4565(90)90032-D

Jablonka, E., and Raz, G. (2009). Epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* 84, 131–176. doi: 10.1086/598822

Jha,R., Singh,A.K.,Yadav, S.,Berrocoso,J.F.D.,and Mishra, B. (2019). Early nutrition programming (in ovo and post-hatch feeding) asa strategy to modulate gut health of poultry. *Front. Vet. Sci.* 6:82. doi: 10.3389/fvets.2019.00082

Jiakui, L., and Xiaolong, W. (2004). Effect of dietary organic versus inorganic selenium in laying hens on the productivity, selenium distribution in egg and seleniumcontent in blood, liver and kidney. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 65–68. doi: 10.1016/j.jtemb.2004.04.002

Kadam, M. M., Barekatain, M. R., K., Bhanja, S., and Iji, P. A. (2013). Prospects of in ovo feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications-a review. *J. Sci. Food Agric.* 93, 3654–3661. doi: 10.1002/jsfa.6301

Kalantar, M., Hosseini, S. M., Hosseini, M. R., Kalantar, M. H., Farmanullah, and Yang, L. G. (2019). Effects of *in ovo* injection of coenzyme Q10 on hatchability, subsequent performance, and immunity of broiler chickens. *Biomed Res. Int.* 2019:7167525. doi: 10.1155/2019/7167525

Kamanli, S., Durmu,ş, I., Yalçin, S., Yildirim, U., and Meral, Ö. (2015). Effect of prenatal temperature conditioning of laying hen embryos: hatching, live performanceand response to heat and cold stress during laying period. *J. Therm. Biol.* 51, 96–104. doi: 10.1016/j.jtherbio.2015.04.001

Koppenol, A., Buyse, J., Everaert, N., Willems, E., Wang, Y., Franssens, L., et al. (2015). Transition of maternal dietary n-3 fatty acids from the yolk to the liver of broiler breeder progeny via the residual yolk sac. *Poult. Sci.* 94, 43–52. doi: 10.3382/ps/peu006

Kühn, E. R., Decuypere, E., Colen, L. M., and Michels, H. (1982). Posthatch growth and development of a circadian rhythm forthyroid hormones in chicks incubated at different temperatures. *Poult. Sci.* 61, 540–549. doi: 10.3382/ps.0610540

Leroux, S., Gourichon, D., Leterrier, C., Labrune, Y., Coustham, V., Rivière, S., et al. (2017). Embryonic environment and transgenerational effects in quail. *Genet. Sel. Evol.* 49, 1–8. doi: 10.1186/s12711-017-0292-7

Lesuisse, J., Li, C., Schallier, S., Leblois, J., Everaert, N., and Buyse, J. (2017). Feeding broiler breeders a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period impairs reproductive performance but enhances broiler offspring performance. *Poult. Sci.* 96, 3949–3959. doi: 10.3382/ps/pex211

Lesuisse, J., Schallier, S., Li, C., Bautil, A., Li, B., Leblois, J., et al. (2018). Multigenerational effects of a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period of broiler breeders. 2. Zootechnical performance of the F1 broiler offspring. *Poult. Sci.* 97, 1666–1676. doi: 10.3382/ps/pey014

Li, S., Zhi, L., Liu, Y., Shen, J., Liu, L., Yao, J., et al. (2016a). Effect of in ovo feeding of folic acid on the folate metabolism, immune function and epigenetic modification of immune effector molecules of broiler. *Br. J. Nutr.* 115, 411–421. doi: 10.1017/S0007114515004511

Li, X., Qiu, J., Liu, H., Wang, Y., Hu, J., Gan, X., et al. (2017). Long-term thermal manipulation in the late incubation period can inhibit breastmuscle developmentby activating endoplasmic reticulum stress in duck (Anasplatyrhynchos domestica). *J. Therm. Biol.* 70, 37–45. doi: 10.1016/j.jtherbio.2017.10.008

Li, Y., Wang, Y., Willems, E., Willemsen, H., Franssens, L., Buyse, J., et al. (2016b). *In ovo* L-arginine supplementation stimulates myoblast differentiation but negatively affects muscle development of broiler chicken after hatching. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100, 167–177. doi: 10.1111/jpn.12299

Liu, H., Liu, J., Yan, X., Li, Q., Zhao, Y., Wang, Y., et al. (2015). Impact of thermal stress during incubation ongene expression in embryonic muscle of Peking ducks (Anasplatyrhynchos domestica). *J. Therm. Biol.* 53, 80–89. doi: 10.1016/j.jtherbio.2015.08.013

Loyau, T., Bedrani, L., Berri, C., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Coustham, V., et al. (2015). Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses tolater 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 theembryo modifies the physiology and body composition of broiler chickens reared in floor pens without affecting breast meat processing quality. *J. Anim. Sci.* 91, 3674–3685. doi: 10.2527/jas.2013-6445

Loyau, T., Collin, A., Yenisey, Ç., Crochet, S., Siegel, P. B., Akşit, M., et al. (2014). Exposure of embryos to cyclically cold incubation temperatures durably affects energy metabolism and antioxidant pathways in broiler chickens. *Poult. Sci.* 93, 2078–2086. doi: 10.3382/ps.2014-03881

Loyau, T., Hennequet-Antier, C., Coustham, V., Berri, C., Leduc, M., Crochet, S., et al. (2016). Thermal manipulation of the chicken embryo triggers differential gene expression in response to a later heat challenge. *BMC Genomics* 17:329. doi: 10.1186/s12864-016-2661-y

Maltby, V., Somaiya, A., French, N. A., andStickland, N. C. (2004). In ovo temperature manipulation influences post-hatch muscle growth in the turkey. *Br. Poult. Sci.* 45, 491–498. doi: 10.1080/00071660412331286190

Massimino, W., Davail, S., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., et al. (2019). Impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in mule ducks. *Front. Physiol.* 10, 1–12. doi: 10.3389/fphys.2019.01495

Matsushima, W., Brink, K., Schroeder, J., Miska, E. A., and Gapp, K. (2019). Mature sperm small-RNA profile in the sparrow: implications for transgenerational effects of age on fitness. *Environ. Epigenetics* 5, 1–11. doi: 10.1093/eep/dvz007

Morisson, M., Coustham, V., Frésard, L., Collin, A., Zerjal, T., Métayer-coustard, S., et al. (2017). *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*. Cham: Springer. Available online at: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-319-31143-2_40-1#citeas

Morita, V., S., Almeida, V. R., Matos, J. B., Vicentini, T. I., vanden Brand, H., et al. (2016). Incubation temperature during fetal development influences morphophysiological characteristics andpreferred ambient temperature of chicken hatchlings. *PLoS ONE* 11:e0154928. doi: 10.1371/journal.pone.0154928

Mujahid, A., and Furuse, M. (2009). Oxidative damage indifferent tissues of neonatal chicks exposed to low environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 152, 604–608. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.01.011

Nichelmann, M., and Tzschentke, B. (2002). Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 131, 751–763. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00013-2

Noble, R. C., Connor, K., and Smith, W. K. (1984). The synthesis and accumulation of cholesteryl esters by the developing embryo of the domestic fowl. *Poult. Sci.* 63, 558–564. doi: 10.3382/ps.0630558

Nyuiadzi, D., Berri, C., Dusart, L., Travel, A., Méda, B., Bouvarel, I., et al. (2020). Short cold exposures during incubation and postnatal cold temperature affect performance, breast meat quality, and welfare parameters in broiler chickens. *Poult. Sci.* 99, 857–868. doi: 10.1016/j.psj.2019.10.024

Ohta, Y., Kidd, M. T., and Ishibashi, T. (2001). Embryogrowth andamino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after *in ovo* administration of amino acids. *Poult. Sci.* 80, 1430–1436. doi: 10.1093/ps/80.10.1430

Oladokun, S., and Adewole, D. I. (2020). In ovo delivery of bioactive substances: an alternative to the use of antibiotic growth promoters in poultry production—a review. *J. Appl. Poult. Res.* 29, 744–763. doi: 10.1016/j.japr.2020.06.002

Paiva, J. T., de Resende, M. D. V., Resende, R. T., de Oliveira, H. R., Silva, H. T., Caetano, G. C., et al. (2018a). Transgenerational epigenetic variance for body weight in meat quails. *J. Anim. Breed. Genet.* 135, 178–185. doi: 10.1111/jbg.12329

Paiva, J. T., De Resende, M. D. V., Resende, R. T., Oliveira, H. R., Silva, H. T., Caetano, G. C., et al. (2018b). A note ontransgenerational epigenetics affecting egg quality traits inmeat-type quail. *Br. Poult. Sci.* 59, 624–628. doi: 10.1080/00071668.2018.1514582

Panserat, S., Marandel,L.,Seiliez,I.,and Skiba-Cassy, S. (2019). New insights on intermediary metabolism for a better understanding of nutrition in teleosts. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 195–220. doi: 10.1146/annurev-animal-020518-115250

Peebles, E. D. (2018). *In ovo* applications inpoultry: a review. *Poult. Sci.* 97, 2322–2338. doi: 10.3382/ps/pey081

Piestun, Y., Harel, M., Barak, M., Yahav, S., and Halevy, O. (2009). Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects onmyoblast proliferationand skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 106, 233–240. doi: 10.1152/japplphysiol.91090.2008

Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J., and Yahav, S. (2008). Thermal manipulations during broiler embryogenesis: Effect on the acquisition of thermotolerance. *Poult. Sci.* 87, 1516–1525. doi: 10.3382/ps.2008-00030

Piestun, Y., Zimmerman, I., andYahav, S. (2015). Thermal manipulations of turkeyembryos: the effect on thermoregulation and development during embryogenesis. *Poult. Sci.* 94, 273–280. doi: 10.3382/ps/peu047

Rao, K., Xie, J., Yang, X., Chen, L., Grossmann, R., and Zhao, R. (2009). Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. *Br. J. Nutr.* 102, 848–857. doi: 10.1017/S0007114509276434

Reed, W. L., and Clark, M. E. (2011). Beyond maternal effects in birds: responses of the embryo to the environment. *Integr. Comp. Biol.* 51, 73–80. doi: 10.1093/icb/icr032

Retes, P. L., Clemente, A. H. S., Neves, D. G., Espósito, M., Makiyama, L., Alvarenga, R. R., et al. (2017). *In ovo* feeding of carbohydrates for broilers—a systematic review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102, 361–369. doi: 10.1111/jpn.12807

Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Caton, J. S., Vonnahme, K. A., Luther, J. S., Hammer, C. J., et al. (2010). Developmental programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development. *J. Anim. Sci.* 88, E61–72. doi: 10.2527/jas.2009-2359

Reynolds, L. P., and Vonnahme, K. A. (2017). Livestock as models for developmental programming. *Anim. Front.* 7, 12–17. doi: 10.2527/af.2017-0123

Roto, S. M., Kwon, Y. M., and Ricke, S. C. (2016). Applications of *in ovo* technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Front. Vet. Sci.* 3:63. doi: 10.3389/fvets.2016.00063

Rühl, R. (2007). Effects of dietary retinoids and carotenoids on immune development: symposium on "nutritionalinfluences on developmental immunology." *Proc. Nutr. Soc.* 66, 458–469. doi: 10.1017/S002966510600509X

Saeed, M., Babazadeh, D., Naveed, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Arain, M. A., et al. (2019). *In ovo* delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in poultry: current knowledge. *J. Sci. Food Agric.* 99, 3727–3739. doi: 10.1002/jsfa.9593

Saunders-Blades, J. L., and Korver, D. R. (2015). Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny *invitro* early innate immune function. *Poult. Sci.* 94, 1233–1246. doi: 10.3382/ps/pev002

Shanmugasundaram, R., Wick, M., and Lilburn, M. S. (2018). Effect of embryonic thermal manipulation on heat shock protein 70expression and immune system development in Pekin duck embryos. *Poult. Sci.* 97, 4200–4210. doi: 10.3382/ps/pey298

Shinder, D., Rusal, M., Giloh, M., and Yahav, S. (2009). Effect of repetitive acute cold exposures during the last phase of broiler embryogenesis on cold resistance through the life span. *Poult. Sci.* 88, 636–646. doi: 10.3382/ps.2008-00213

Shinder, D., Ruzal, M., Giloh, M., Druyan, S., Piestun, Y., and Yahav, S. (2011). Improvement of cold resistanceand performanceof broilers by acutecold exposureduring lateembryogenesis. *Poult. Sci.* 90, 633–641. doi: 10.3382/ps.2010-01089

Smirnov, A., Tako, E., Ferket, P. R., and Uni, Z. (2006). Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by *in ovo* feeding of carbohydrates. *Poult. Sci.* 85, 669–673. doi: 10.1093/ps/85.4.669

Surai, P. F., Fisinin, V. I., and Karadas, F. (2016). Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* 2, 1–11. doi: 10.1016/j.aninu.2016.01.001

Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D. C., Lammers, A., Alkie, T. N., and Sharif, S. (2018). Effects of early feeding and dietary interventions on development of lymphoid organs and immune competence in neonatal chickens: a review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 201, 1–11. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.05.001

Thanabalan, A., and Kiarie, E. G. (2021). Influence of feeding omega-3 polyunsaturated fatty acids to broiler breeders on indices of immunocompetence, gastrointestinal, and skeletal development in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* 8:653152. doi: 10.3389/fvets.2021.653152

Torres, C. A., and Korver, D. R. (2018). Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. *Poult. Sci.* 97, 2996–3003. doi: 10.3382/ps/pey136

Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., and Kedar, O. (2005). In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poult. Sci.* 84, 764–770. doi: 10.1093/ps/84.5.764

Uni, Z., and Ferket, R. P. (2004). Methods for early nutrition and their potential. *Worlds. Poult. Sci. J.* 60, 101–111. doi: 10.1079/WPS20038

Veron, V., Marandel, L., Liu, J., Vélez, E. J., Lepais, O., Panserat, S., et al. (2018). DNA methylation of the promoter region of bnip3 and bnip3l genes induced by metabolic programming 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Genomics* 19, 1–14. doi: 10.1186/s12864-018-5048-4

Vitorino Carvalho, A., Hennequet-antier, C., Brionne, A., Crochet, S., Jimenez, J., Courouss,é, N., et al. (2021). Embryonic thermal manipulationimpacts the postnatal transcriptome response of heat-challenged Japanese quails. *BMC Genomics* 22, 1–13. doi: 10.1186/s12864-021-07832-7

Vitorino Carvalho, A., Hennequet-Antier, C., Crochet, S., Bordeau, T., Courouss,é, N., Cailleau-Audouin, E., et al. (2020). Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. *PLoS ONE* 15:e0227700. doi: 10.1371/journal.pone.0227700

Wang, G., Liu, J., Xiang, S., Yan, X., Li, Q., Cui, C., et al. (2014). Influence of *in ovo* thermal manipulation on lipid metabolism in embryonic duck liver. *J. Therm. Biol.* 43, 40–45. doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.05.001

Wang, Y. W., Sunwoo, H., Cherian, G., and Sim, J. S. (2004). Maternal dietary ratio of linoleic acid to α-linolenic acid affects the passive immunity of hatching chicks. *Poult. Sci.* 83, 2039–2043. doi: 10.1093/ps/83.12.2039

Wei, X. J., Ni, Y. D., Lu, L. Z., Grossmann, R., and Zhao, R. Q. (2011). The effect of equol injection in ovo on posthatch growth, meat quality and antioxidation in broilers. *Animal* 5, 320–327. doi: 10.1017/S1751731110001771

Wu, S., Guo, W., Li, X., Liu, Y., Li, Y., Lei, X., et al. (2019). Paternal chronic folate supplementation induced the transgenerational inheritance of acquired developmental and metabolic changes in chickens. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286:20191653. doi: 10.1098/rspb.2019.1653

Xie, C., Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., Dong, X. Y., andZou, X. T. (2019). Effect of iron glycine chelate supplementation on egg quality and egg iron enrichment in laying hens. *Poult. Sci.* 98, 7101–7109. doi: 10.3382/ps/pez421

Yalçin, S., Özkan, S., Çabuk, M., Buyse, J., Decuypere, E., and Siegel, P. B. (2005). Pre- and postnatal conditioning induced thermotolerance onbody weight, physiological responses and relative asymmetry of broilers originating from young and old breeder flocks. *Poult. Sci.* 84, 967–976. doi: 10.1093/ps/84.6.967

Yan, X. P., Liu, H. H., Liu, J. Y., Zhang, R. P., Wang, G. S., Li, Q. Q., et al. (2015). Evidence in duck for supporting alteration of incubation temperature may have influence on methylation of genomic DNA. *Poult. Sci.* 94, 2537–2545. doi: 10.3382/ps/pev201

Yu, L. L., Gao, T., Zhao, M. M., Lv, P. A., Zhang, L., Li, J. L., et al. (2018). Effects of *in ovo* feeding of l-arginine on breast muscle growth and protein deposition in post-hatch broilers. *Animal* 12, 2256–2263. doi: 10.1017/S1751731118000241

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022Andrieux, Petit, Collin, Houssier, Métayer-Coustard, Panserat, Pitel and Coustham. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Metabolomic analysis of nutrient sources in the embryonic egg of two divergent lines for meat ultimate pH

Petit Angélique[1], Réhault-Godbert Sophie[1], Nadal-Desbarats Lydie[2], Cailleau-Audouin Estelle[1], Jimenez Justine[1], Chartrin Pascal[1], Raynaud Emilie[1], Bernardet Nelly[1], Chesse Magali[1], Le Bihan-Duval Elisabeth[1], Métayer-Coustard Sonia[1]

[1]BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France
[2]INSERM, Université de Tours, UMR 1253, Université de Tours, 37000 Tours, France

Divergent selection on the ultimate pH (pHu) of the breast muscle has allowed the creation of the pHu+ and pHu- lines, which represent a unique model to study the genetic and physiological control of energy stores and meat quality in chicken. Indeed, pHu+ and pHu- chicks (presenting low and high-energy status, respectively) exhibit different nutrient and hormone response capacities at hatch.

The avian egg forms a natural chamber that contains all the elements that are necessary for the survival and development of the embryo. During the first two weeks of development, nutrients are mainly provided by the lipids and proteins contained in the yolk. In the last third of development, embryo will use other nutrients present in the egg white and amniotic fluid. We hypothesized that a variation in these nutrient sources could contribute to metabolic and developmental differences that are present at hatch between the pHu+ and pHu- lines. To address this question, we analyzed the physical and chemical characteristics of the yolk and performed some metabolomic analyses (1H-nuclear magnetic resonance, NMR) at E0 (the first day of incubation) and E10 (after 10 days of incubation) for yolk and at E10 for amniotic fluid.

Metabolomic analysis evidenced changes in yolk composition between E0 and E10 stages. However, no difference in metabolomic profile was found between the two lines. In contrast, chemical analysis revealed a higher lipid percentage at E0 in the pHu+ line (32,9%) that appeared particularly low in the pHu- line (27,7%). On the other hand, analysis by 1H-NMR spectroscopy of the E10 amniotic fluid showed a different metabolic signature between the lines with leucine, isoleucine, oxoisocaproate, citrate and β-glucose being superabundant in pHu+ line while choline and inosine being superabundant in pHu- line.

These results highlight quantitative and qualitative differences in the nutrients potentially available to developing embryos, which could explain metabolic and developmental differences between the pHu+ and pHu- lines. The molecular characterization of the different compartments of the egg will help in understanding the metabolic orientation of the embryos (according to their nutrient sources and genetics) and could contribute to identify biomarkers reflecting the animal's energy status in ovo.

Key words: Embryo; Development; Egg; Nutrient; Metabolome; Energy status

INOVE : Recherche d'INdicateurs in OVo du statut Energétique de l'animal pour des applications en sélection et en élevage.

A Petit[1], S Réhault-Godbert[1], L Nadal-Desbarats[2], E Cailleau-Audouin[1], P Chartrin[1], E Raynaud[1], J Jimenez[1], S Tesseraud[1], C Berri[1], E Le Bihan-Duval[1], S Métayer-Coustard[1]

[1] INRAE, Université de Tours, BOA, 37380, Nouzilly, France

[2] INSERM, Université de Tours, iBrain, 37000, Tours, France

Champ thématique : ☒ CT1 Reproduction et développement précoce
☐ CT2 Comportements, adaptation et bien-être des animaux
☒ CT3 Nutrition, fonctions productives et produits animaux
☐ CT4 Conception et évaluation de systèmes d'élevage durables

Résumé

Chez les oiseaux, l'éclosion est une étape critique, très énergivore, qui a des conséquences sur les taux d'éclosion, la qualité des poussins et à plus long terme sur la santé, la croissance des animaux et la qualité du produit final. Le statut énergétique est donc un critère essentiel pour les performances et la robustesse des oiseaux depuis leur éclosion jusqu'à leur abattage. L'étude de deux lignées de poulet sélectionnées de façon divergente sur le pH ultime de la viande, un marqueur des réserves énergétiques musculaires, a montré que ce statut était établi dès l'éclosion (Métayer-Coustard et al., 2021, https://doi.org/10.3389/fphys.2021.643580). Les poussins pHu+ (à faibles réserves énergétiques) et pHu- (à fortes réserves énergétiques) se différencient rapidement après l'éclosion sur plusieurs caractéristiques liées au métabolisme protéino-énergétique, notamment sur leurs capacités à utiliser les différentes sources énergétiques disponibles au niveau musculaire. Le projet INOVE visait à évaluer dans quelle mesure l'environnement nutritionnel de l'embryon pouvait contribuer aux différences métaboliques observées entre les deux lignées et à trouver des biomarqueurs précoces du statut énergétique par des approches ciblées ou à haut-débit. Juste avant l'incubation (E0), le vitellus de la lignée pHu+ est plus riche en lipides que celui de la lignée pHu- (32,9 % contre 27,7 %). Bien que la spectroscopie RMN-1H-ait montré de nets changements dans la composition du vitellus entre E0 et E10, il n'y avait pas d'effet lignée. En revanche, l'analyse par RMN-1H réalisée sur le liquide amniotique prélevé au 10ème jour embryonnaire (E10) discrimine

clairement les deux lignées. Le liquide amniotique des pHu+ est en effet plus riche en leucine, isoleucine, 2-oxoisocaproate, citrate et glucose, alors que la choline et l'inosine étaient plus abondantes dans celui de la lignée pHu-. Ces différences quantitatives et qualitatives dans les métabolites et nutriments apportés par l'œuf contribuent très vraisemblablement aux différences métaboliques et développementales observées post-éclosion entre les lignées pHu+ et pHu-. Ces résultats font l'objet d'un premier article récemment accepté dans la revue *Scientific Reports* (**Article 1**). Dans une seconde partie, le métabolisme in ovo des embryons des deux lignées a été étudié au travers de l'analyse en spectroscopie RMN-1H du liquide chorioallantoïque, considéré entre autres comme le réceptacle des déchets libérés par l'embryon. L'analyse de ce liquide permettra de compléter nos premiers résultats et d'avoir une vision globale de la dynamique d'assimilation des nutriments de l'œuf par les embryons des deux lignées et de mieux comprendre les interactions génétique/nutriments de l'œuf. Les résultats de cette étude font l'objet d'un deuxième article en préparation (**Article 2**).

Suites données à ce travail ?

Le projet INOVE fût à l'origine du projet CASDAR Chick'Tip (2018-2021) et de la thèse d'Angélique PETIT sur la compréhension de la mise en place des phénotypes précoces chez l'oiseau (2020-2023, financement de l'Université de Tours).

Mots-clés : embryon, métabolisme, *in ovo*, statut énergétique

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté Égalité Fraternité

INRAE

Projet « INOVE » – Crédit incitatif 2017

Recherche d'Indicateurs *in Ovo* du statut Energétique de l'animal

[1] INRAE, Université de Tours, BOA, 37380, Nouzilly

[2] INSERM, Université de Tours, iBrain, 37000, Tours

PST Analyse des Systèmes Biologiques

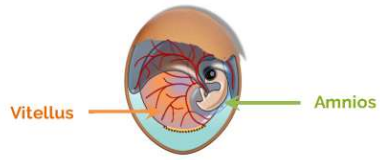
Petit A.[1], Réhault-Godbert S.[1], Nadal-Desbarats L.[2], Cailleau-Audouin E.[1], Chartrin P.[1], Tesseraud S.[1], Berri C.[1], Le Bihan-Duval E.[1], Métayer-Coustard S.[1]

INTRODUCTION Chez les poulets de chair, la sélection pour une croissance et un développement musculaire accrus s'est accompagnée d'importantes modifications anatomiques, physiologiques et métaboliques. Une diminution des réserves énergétiques musculaires, évaluée par la teneur en glycogène *in vivo*, a été observée chez ces animaux **[1, 2]**. Le progrès génétique n'a pas été sans contrepartie négative avec des impacts sur la robustesse des animaux, leurs performances de reproduction et la qualité des produits (viande). Une sélection divergente sur le pH ultime du muscle *Pectoralis major* a permis la création des lignées pHu+ et pHu-, qui se différencient par leurs réserves en glycogène musculaire et ce, dès l'éclosion **[3]**. Elles représentent un modèle unique pour étudier le contrôle génétique et biologique de ce caractère, chez le poulet. L'objet de cette étude est d'évaluer l'impact de l'environnement nutritionnel périnatal, sur la mise en place précoce des orientations métaboliques, observées dans les deux lignées.

MATERIELS ET METHODES

Du vitellus, du liquide amniotique (amnios) et du liquide allantoïque ont été prélevés sur des œufs embryonnés des lignées pHu+ et pHu- (N=15 par lignée) avant incubation **(E0)** et/ou à 10 jours de développement embryonnaire **(E10)**. Une analyse de la teneur en lipides du vitellus a été réalisée comme décrit dans Chartrin et al., 2005 à E0 et à E10. Les profils métabolomiques du vitellus et de l'amnio (principales sources de nutriments pour les embryons) et du liquide allantoïque (reflet indirect du métabolisme des embryons) ont été obtenus par spectroscopie 1H-RMN.

PRINCIPALES SOURCES DE NUTRIMENTS POUR L'EMBRYON



Teneur en lipides du vitellus

Teneur en lipides à E0 (pHu+ > pHu-)

Profil métabolique du vitellus

-Pas de modèle discriminant pHu+/pHu- à E0 et E10.

-Différence quantitative pour certains métabolites comme la leucine, l'hypoxanthine plus abondants chez les pHu+ ou le formate plus abondant chez les pHu-.

(Petit A. et al., 2022)

Profil métabolique de l'amnios

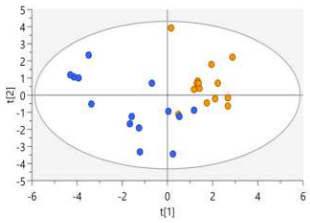


Fig. 1 : Score plot obtenu après une analyse multivariée par PLS-DA (pHu- en bleu et pHu+ en orange) à E10.

Paramètres de qualité du modèle

R2Y = 0.754; Q2= 0,605; CV-ANOVA = 0.00011.

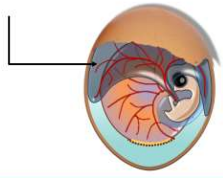
Métabolites discriminants majeurs

Leucine, isoleucine et β-glucose (pHu+ > pHu-).

Inosine et choline (pHu-> pHu+).

CARACTÉRISATION INDIRECTE DU MÉTABOLISME DES EMBRYONS

Profil métabolique du liquide allantoïque



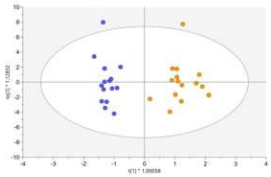


Fig. 2 : Score plot obtenu après une analyse multivariée par OPLS-DA (pHu- en bleu et pHu+ en orange) à E10.

Paramètres de qualité du modèle

$R^2Y = 0.92$; $Q^2 = 0.81$; *CV-ANOVA = 5.1e-05*

Principaux métabolites discriminants

Leucine, isoleucine et cytidine (pHu+ > pHu-)

Hypoxanthine, créatine et choline (pHu- > pHu+).

CONCLUSION Les nutriments disponibles dans l'œuf pour les embryons pHu sont différents entre les deux lignées dès le début d'incubation. L'analyse indirecte du métabolisme des embryons a révélé une signature métabolique différente à E10. Ces résultats originaux suggèrent un impact potentiel des nutriments disponibles dans l'œuf sur la mise en place très précoce des orientations métaboliques de ces deux lignées. Toutefois, les mécanismes sont encore mal connus. Une thèse permettant de comprendre et décrypter les mécanismes qui conduisent à l'élaboration de ces deux phénotypes a donc été initiée. Ces approches permettront à plus long terme d'envisager des leviers nutritionnels précoces visant à réorienter le métabolisme des embryons présentant un statut énergétique plus faible.

Références : **[1]** Berri et al., 2001; **[2]** Berri et al., 2007; **[3]** Métayer-Coustard et al., 2021

Remerciements : UE PEAT (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12) pour la production et la fourniture des œufs embryonnés.

Centre
Val de Loire, Nouzilly.

UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture
Tél. : + 33 (0) 2 47 42 75 31
contact : sonia.metayer-coustard@inrae.fr

7th EAAP International Symposium on Energy and Protein metabolism and nutrition (ISEP), Septembre 2022, Grenade, Espagne

Early carbohydrate metabolism in chicken lines divergently selected on ultimate pH, a proxy for muscle glycogen reserves

A Petit[1], S Tesseraud[1], T Bordeau[1], E Cailleau-Audouin[1], E Godet[1], M Palomar-Lloris[1], J Delaveau[2], C Rat[2], E Le Bihan-Duval[1], C Berri[1], S Métayer-Coustard[1]

[1]INRAE, Université de Tours, BOA, Nouzilly, France.
[2]INRAE, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, Nouzilly, France

keywords

Chicks, muscle, glycogen, carbohydrate metabolism

Introduction

The selection of broiler lines for increased growth and muscle development has been accompanied by significant anatomical, physiological and metabolic changes. As a consequence, physiological limitations have appeared, affecting both the robustness of the animals and the quality of the products (meat). In particular, in modern broiler lines, a decrease in muscle energy reserves, assessed by glycogen content *in vivo*, has been observed (Berri et al., 2001, 2007). Divergent selection on *Pectoralis major* muscle pHu allowed the creation of the pHu+ and pHu- lines, which differentiate on their glycogen reserves at the muscle level and represent a unique model to study the genetic and biological control of this trait in chicken. The present study aimed to describe the early mechanisms involved in the establishment of the pHu+ and pHu- phenotypes by monitoring between day 16 *in ovo* and 5 days post hatch the expression and/or activity of key enzymes involved in glycogen synthesis and degradation (glycogen synthase and glycogen phosphorylase) as well as several molecular actors related to carbohydrate metabolism.

Material and Methods

The study was performed on embryo and chicks from the two lines (pHu+/pHu-). *Pectoralis major* muscle sampling was performed on 16-day-old embryos (E16; N=7 pools of 3 individuals per line), hatched (D0) and 5-day-old (D5) chicks (at least N=12 par age and per line).

The *in vivo* glycogen content was estimated at each stage through the measurement of the glycolytic potential that reflects the glycogen that is in the tissue prior to slaughter as it considers the main intermediates of glycogen degradation (glucose-6-phosphate, free glucose, and lactate; Monin and Sellier, 1985). The glycogen phosphorylase activity was measured at D5 using the glycogen phosphorylase activity kit from abcam (ab273271). For cell signaling analyses, the muscle lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with the appropriate antibody. Bands were visualized with Infrared Fluorescence using the Odyssey Imaging System and quantified with the Odyssey imaging system software.

Data are presented as mean ± SEM. In case of normal residual and variance distribution they were subjected to ANOVA to assess line and stage effect and their interaction. In this case, the comparisons of means for each significant effect were performed using Fisher's least significant difference test. When the residuals were not normally distributed and variances were not homogeneous between groups, data were analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis test and a multiple comparison test. Differences were considered to be significant when p values were below 0.05.

Results and Discussion

The *in vivo* glycogen content was higher in pHu− than in pHu+ *Pectoralis major* muscles at hatching and 5 days post-hatch while no difference was observed in E16 embryos. Regardless of the line, the muscle lactate content increased from E16 to D5. Concerning muscle glycogen content, its evolution with time depends on the line: it increased between E16 and D5 in pHu- while it remained unchanged between E16 and hatching before increasing in pHu+. This result suggests a difficulty for pHu+ to increase their glycogen stock between E16 and hatching, either because of a synthesis deficit or a more pronounced utilization at hatching.

To understand the difference in glycogen storage between the two lines, glycogen synthase (GS) and glycogen phosphorylase (PYG), involved in glycogen synthesis and degradation, respectively, were studied. Five days after hatching, the level of GS phosphorylation was

similar between the two lines. In contrast, PYG expression was higher in the muscle of pHu+ chicks compared to pHu-. In addition, specific PYG activity was more than 3-fold higher than in pHu- muscle at the same age (D5). Analyses are underway to define when during development (E16 or hatching) differences in PYG expression and activity are established between the two lines.

Conclusion and Implications

Differences in energy status between the pHu+ and pHu- lines appear very early in development, probably between E16 and hatching. Our results show for the first time that the differences in muscle glycogen content observed at hatching between the two lines are related to differences in glycogen degradation, which is much more pronounced in the pHu+ than in the pHu- line. The higher glycogen utilization observed in pHu+ chicks could be related to their greater propensity for protein synthesis and growth, which is expressed from the early stages of postnatal development (Métayer-Coustard et al., 2021).

Acknowledgments

We thank the staff of PEAT INRAE Poultry Experimental Facility (2018, https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12) for producing and rearing animals.

References

- Berri C et al. 2001. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. Poultry Sci. 80, 833-38.
- Berri C et al. 2007. Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. J. Anim. Sci. 85 (8), 2005-11.
- Métayer-Coustard S et al. 2021. Early Growth and Protein-Energy Metabolism in Chicken Lines Divergently Selected on Ultimate pH. Frontiers in Physiology 12, 643580.
- Monin G and Sellier P 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. Meat Sci. 13(1), 49-63.

Nutrition précoce et orientation métabolique d'embryons de poulets divergents pour leurs réserves énergétiques musculaires

Petit A.[1], Tesseraud S.[1], Beauclercq S.[1], Nadal-Desbarats L.[2], Cailleau-Audouin E.[1], Berri C.[1], Le Bihan-Duval E.[1], Métayer-Coustard S.[1]

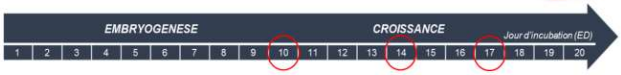
INTRODUCTION

Chez les oiseaux, les embryons dépendent exclusivement du contenu nutritif de l'œuf d'origine maternelle. La caractérisation fine des différents compartiments de l'œuf est donc un élément clé pour comprendre le rôle des nutriments sur l'orientation métabolique précoce de l'embryon.

Nos travaux ont été réalisés sur un modèle unique de deux lignées divergentes pour le pH ultime de la viande (pHu+ et pHu-), critère reflétant les réserves énergétiques musculaires (r^2 = -0,97) (Le Bihan-Duval et al., 2018). Des analyses métabolomiques et biochimiques ont montré des différences qualitatives et quantitatives entre lignées pour les nutriments disponibles dans le vitellus et le liquide amniotique des embryons (e.g. acides gras, acides aminés ramifiés…) (**Petit et al., 2022**).

En raison de sa capacité à stocker les déchets azotés et autres composés pour la nutrition des embryons, le liquide allantoïque a ensuite été caractérisé pour fournir des indicateurs indirects du métabolisme des embryons.

MATERIELS ET METHODES



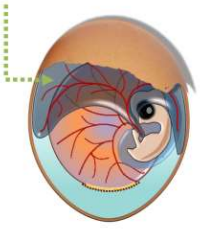
Les œufs embryonnés ont été collectés au pic de ponte puis incubés dans des conditions standard de température (37,8°C) et d'humidité (56%). Du liquide allantoïque a été prélevé aux jours 10, 14 et 17 qui correspondent à des phases spécifiques du développement embryonnaire :

E10 : Alimentation de nature lipidique et glucidique
E14 : Période très active du métabolisme énergétique
E17 : Accès à de nouveaux substrats de nature protéique et préparation de l'embryon à l'éclosion

Les profils métabolomiques ont été obtenus par spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN). Les analyses multivariées (ACP et OPLS-DA) ont été réalisées à l'aide du logiciel SIMCA 16 sur l'ensemble des données puis à chacun des stades. La qualité des modèles a été évaluée par les valeurs de R^2Y (capacité à discriminer), Q^2 (capacité prédictive) et CV-ANOVA (fiabilité).

RESULTATS

Liquide allantoïque



- ✓ Effet âge plus discriminant que l'effet lignée (Fig. 1)
- ✓ Augmentation de la variabilité inter-individuelle au cours du développement embryonnaire (Fig. 1)
- ✓ Modèle discriminant et fiable pour chaque stade étudié (e.g. Fig. 2)

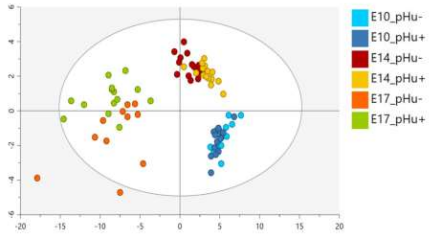


Fig. 1 : Score plot obtenu par OPLS-DA pour les échantillons de liquide allantoïque prélevés à E10, E14 et E17 chez les pHu+ et pHu-. R^2Y = 0,50 ; Q^2 = 0,39 et CV-ANOVA = 5,6e-11

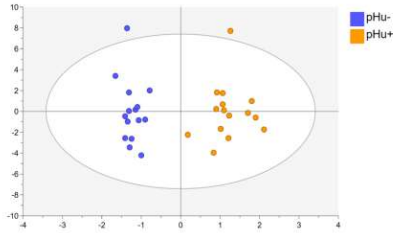


Fig. 2 : Score plot obtenu par OPLS-DA à E10 pour les échantillons de liquide allantoïque prélevés chez les pHu+ et pHu-. R^2Y = 0,92 ; Q^2 = 0,81 ; CV-ANOVA = 5,1e-05 et X = 18 métabolites

Principaux métabolites discriminants au cours du développement embryonnaire

pHu-
Sur-représentation en substrats énergétiques (glucose, créatine), choline et métabolites impliqués dans le statut redox (glycine, glutamate).

pHu+
Sur-représentation en acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine, valine), marqueurs du catabolisme des acides aminés (3-hydroxyisobutyrate, alanine…), oxydation des acides gras (3-hydroxybutyrate, bétaïne…), glycolyse anaérobie (lactate), intermédiaires du cycle de Krebs (citrate, fumarate) et formate.

CONCLUSION

La caractérisation du vitellus, du liquide amniotique et maintenant du liquide allantoïque permet d'obtenir une vision d'ensemble sur l'environnement nutritionnel des embryons divergents pour leurs réserves énergétiques musculaires. De plus, le métabolome du liquide allantoïque a révélé des **signatures métaboliques spécifiques** chez les embryons pHu+ et pHu-. L'orientation métabolique semble établie précocement puisque dès le stade E10, le modèle obtenu montre une discrimination nette des deux lignées. Comme observé à des stades plus tardifs (6 semaines post-éclosion), les embryons pHu+ ont recours à différentes voies cataboliques pour produire de l'énergie (oxydation des lipides, catabolisme des acides aminés, glycolyse anaérobie…). Ceci pourrait être le reflet d'une adaptation de l'embryon aux nutriments disponibles dans l'œuf et/ou de réserves en glycogène musculaire plus faibles chez les pHu+ que les pHu-. Ces résultats doivent être validés par l'étude de l'ontogenèse des principales voies de signalisation et régulateurs du métabolisme protéino-énergétique dans le muscle et le foie.

[1] INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly
[2] INSERM, Université de Tours, iBrain, 37000 Tours

Centre Val de Loire, Nouzilly
UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture
Tél. : + 33 (0) 2 47 42 76 88
Contact : angelique.petit@inrae.fr

Nutrition précoce et orientation métabolique d'embryons de poulets, divergents pour leurs réserves énergétiques musculaires

Petit Angélique[1], Sophie Tesseraud[1], Stéphane Beauclercq[1], Lydie Nadal-Desbarats[2], Estelle Cailleau-Audouin[1], Cécile Berri[1], Elisabeth Le Bihan-Duval[1], Sonia Métayer-Coustard[1]

[1] INRAE, Université de Tours, BOA, 37380, Nouzilly, France

[2] INSERM, Université de Tours, iBrain, 37000, Tours, France

Chez les oiseaux, le développement embryonnaire s'effectue *in ovo*, indépendamment de la mère. La caractérisation des différents compartiments de l'œuf apparait donc comme un élément clé pour comprendre l'impact des nutriments sur la mise en place précoce des orientations métaboliques des embryons, ce qui constitue un des objectifs de la thèse car conditionnant leur statut énergétique. Nos travaux sont réalisés sur un modèle unique de deux lignées divergentes pour le pH ultime de la viande (pHu+ et pHu-), reflet des réserves énergétiques musculaires (corrélation négative de 0,97). Des analyses métabolomiques et biochimiques ont montré des différences qualitatives et quantitatives pour les nutriments potentiellement disponibles dans le vitellus et le liquide amniotique des embryons (e.g. acides gras, acides aminés ramifiés… ; Petit et al., 2022). Une analyse métabolomique par RMN a ensuite été réalisée aux jours 10, 14 et 17 du développement embryonnaire (E10, E14, E17) sur le liquide allantoïque. Son rôle dans le stockage des déchets azotés en fait un compartiment pertinent pour caractériser le métabolisme des embryons, de manière indirecte. Des analyses multivariées ont permis d'obtenir des modèles discriminants, prédictifs et fiables pour chacun des stades étudiés. L'étude des fonctions biologiques montre que le liquide allantoïque des embryons pHu+ est enrichi en intermédiaires du cycle de Krebs, en formate mais aussi en biomarqueurs du catabolisme des acides aminés, oxydation des lipides et glycolyse anaérobie. Les pHu- présentent quant à eux une concentration plus élevée en substrats énergétiques, niacine (vitamine B3) et antioxydants. Pour conclure, la caractérisation du liquide allantoïque met en évidence des signatures métaboliques propres aux embryons pHu+ et pHu-, dès le stade E10. Pour compléter ces résultats, l'ontogenèse des voies de signalisation et régulateurs du métabolisme protéino-énergétique dans le muscle et le foie est en cours d'analyse.

Nutrition et orientation métabolique précoce de poulets issus de deux lignées divergentes pour leurs réserves énergétiques musculaires.

INRAE Centre Val de Loire, UMR083 Biologie des Oiseaux et Aviculture

Améliorer la robustesse des animaux vise à promouvoir leurs capacités d'adaptation à des ressources alimentaires variées et au changement climatique, tout en préservant leurs capacités de reproduction, leur santé et leur bien-être. Cela amène à considérer les interactions génotype-environnement pour atteindre des systèmes d'élevage plus durables. Le projet de thèse vise à mieux comprendre l'impact des nutriments disponibles dans l'œuf (e.g. glucides, protéines…) et de la sélection génétique sur la mise en place précoce des orientations métaboliques (e.g. statut énergétique, métabolisme protéique…). Nos travaux ont été réalisés sur un modèle unique de deux lignées divergentes pour le pH ultime de la viande (pHu+ et pHu-), critère reflétant les réserves en glycogène musculaire (r^2 = -0,97). Ces dernières sont essentielles car elles peuvent impacter la qualité des produits, les performances des animaux et leur robustesse depuis l'éclosion jusqu'à l'âge d'abattage. La caractérisation fine du vitellus et du liquide amniotique par des approches de biochimie et de métabolomique a montré des différences qualitatives et quantitatives pour les nutriments disponibles dans l'œuf (e.g. acides gras, acides aminés ramifiés…) [**1**]. Ces premiers résultats ont permis de mettre en évidence un environnement nutritionnel différent entre les embryons pHu+ et pHu-. Pour déterminer le stade à partir duquel les orientations métaboliques se mettent en place chez ces deux lignées, une analyse de spectroscopie par ^{1}H-RMN a été réalisée aux jours 10, 14 et 17 du développement embryonnaire sur le liquide allantoïque. Son rôle dans le stockage des déchets azotés et autres composés pour la nutrition des embryons en fait un compartiment pertinent pour fournir des indicateurs indirects du métabolisme des embryons. Chez les pHu+, l'étude des métabolites discriminants a montré une sur-représentation en leucine, isoleucine, valine, alanine, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxybutyrate, bétaïne… En raison d'une disponibilité moindre en substrats énergétiques (e.g. glucose), les embryons de la lignée pHu+ ont recours à différentes voies cataboliques pour produire de l'énergie, comme observé à des stades plus tardifs (éclosion et 6 semaines d'âge) [**2**,**3**]. En plus d'obtenir une vision d'ensemble sur l'environnement nutritionnel, le métabolome du liquide allantoïque a révélé des signatures métaboliques spécifiques chez les embryons pHu+

et pHu- dès le stade E10. Ces résultats doivent être complétés par l'étude de l'ontogenèse des principales voies de signalisation et régulateurs du métabolisme protéino-énergétique dans deux tissus d'intérêt : le muscle et le foie. L'ensemble des données obtenues permettra de fournir des premiers éléments pour l'élaboration de stratégies nutritionnelles précoces visant à moduler les réserves énergétiques du poussin, améliorer sa qualité à l'éclosion et favoriser son développement ultérieur.

Mots clés : Poulet, embryon, métabolisme, nutrition, phénotype

[**1**] Petit A, et al. Nutrient sources differ in the fertilised eggs of two divergent broiler lines selected for meat ultimate pH. *Sci Rep*. 2022;12(1):5533.

[**2**] Métayer-Coustard S, et al. Early Growth and Protein-Energy Metabolism in Chicken Lines Divergently Selected on Ultimate pH. *Front Physiol*. 2021;12:643580.

[**3**] Beauclercq S, et al. Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality. *J Proteome Res*. 2016;15(4):1168-78.

Angélique PETIT

Nutrition *in ovo* et mise en place de l'orientation métabolique chez les poulets de chair

Résumé :

Le développement de l'embryon dépend de l'environnement dans lequel il baigne et des nutriments disponibles. Une connaissance plus approfondie des effets de la nutrition sur la programmation métabolique et l'élaboration des capacités d'adaptation est essentielle pour atteindre des objectifs d'élevage plus durables conciliant bien-être animal, santé, robustesse et qualité des produits. L'étude de deux lignées divergentes pour leurs réserves en glycogène musculaire (pHu+ et pHu-) nous a permis de **1)** caractériser l'environnement nutritionnel des embryons, **2)** identifier des signatures métaboliques dans le liquide allantoïque puis, **3)** décrire l'ontogenèse des principales voies et fonctions régissant le métabolisme hépatique et musculaire au cours du développement pré- et post-éclosion. *In ovo*, des différences dans la composition en nutriments ont été observées dans le vitellus et le liquide amniotique. L'étude comparée des deux lignées entre le 12ème jour du développement embryonnaire et le 8ème jour de vie a ensuite révélé des différences d'expression de gènes dans le foie et le muscle *Pectoralis major*. Ces différences se traduisent par des signatures métaboliques spécifiques dans le liquide allantoïque, matrice qui permet d'évaluer le métabolisme des embryons de manière indirecte. Plus précisément, les embryons pHu- privilégient les glucides pour produire de l'énergie tandis que les embryons pHu+ ont recours à diverses voies cataboliques telles que la dégradation des protéines, le catabolisme des acides aminés et la β-oxydation des acides gras. A l'éclosion, les poussins de la lignée pHu+ ont un démarrage plus difficile et sont moins robustes que les pHu-.

Mots clés : Métabolisme, nutrition périnatale, ontogenèse, embryon, poussin

Summary:

Embryo development depends on the environment in which it is immersed and the nutrients available. A better understanding of the effects of nutrition on metabolic programming and the development of adaptive capacities is essential to achieve more sustainable breeding objectives that combine animal welfare, health, robustness and product quality. The study of two lines divergent for their muscle glycogen reserves (pHu+ and pHu-) allowed us to **1)** characterize the nutritional environment of embryos, **2)** identify metabolic signatures in allantoic fluid then, **3)** describe the ontogeny of the main pathways and functions governing liver and muscle metabolism during pre- and post-hatching development. *In ovo*, differences in nutrient composition were observed in yolk and amniotic fluid. A comparative study of the two lines between day 12 of embryonic development and day 8 of life then revealed differences in gene expression in the liver and *Pectoralis major* muscle. These differences translate into specific metabolic signatures in the allantoic fluid, a matrix that allows indirect assessment of embryo metabolism. More specifically, pHu- embryos favor carbohydrates for energy production, while pHu+ embryos resort to various catabolic pathways such as protein degradation, amino acid catabolism and β-fatty acid oxidation. At hatching, the chicks of the pHu+ line have a more difficult start and are less robust than the pHu- line.

Key words: Metabolism, perinatal nutrition, ontogeny, embryo, chick