

LE CHALLENGE JEUNE/REALIMENTATION : UN MODELE SANS GAVAGE POUR INDUIRE UN STOCKAGELIPIDIQUE DANS LE FOIE DU CANARD MULARD

Zwick Laura-Lou¹, Roy Jérôme¹, Panserat Stéphane¹, Houssier Marianne¹

¹Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, INRAE, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint
Pée sur Nivelle, 64310, France

marianne.houssier@univ-pau.fr

RÉSUMÉ

Cette étude s'intéresse aux réponses métaboliques du foie chez des canards mulards âgés de 9 semaines ayant subi différents cycles de jeûne/ réalimentation. Le but est d'évaluer la capacité de ce nouveau protocole en tant que modèle d'étude sans gavage de la stéatose hépatique chez le canard mulard.

Le premier protocole a permis d'établir une cinétique d'évolution des poids de foie à la suite d'un repas de 1h heure précédé par un jeûne de 23h. Le poids des foies a augmenté de façon significative jusqu'à 12h après la phase de réalimentation puis a diminué jusqu'à son niveau initial 24h après. Lors d'un second protocole, une seconde phase de réalimentation a été appliquée 12h après la première. Le poids des foies et le pourcentage en glycogène ont augmenté de façon significative après chaque phase de réalimentation et ont retrouvé leur niveau initial 24h après le dernier repas. En parallèle, le pourcentage en lipides totaux n'a pas augmenté après la première phase de réalimentation précédée de 23h de jeûne, mais uniquement après la seconde phase de réalimentation (12h après le premier repas) avec un maximum mesuré 24h après le second repas.

Cette étude a donc permis de mesurer une hausse du taux de lipides hépatiques après deux repas volontaires chez le canard mulard, suggérant que ce protocole pourrait constituer un bon modèle d'étude sans gavage de la stéatose hépatique.

ABSTRACT

The fasting/re-feeding challenge: a force-feeding-free model to induce lipid storage in the liver of the Mulard duck

This study focuses on the metabolic responses of the liver in 9-week-old Mulard ducks subjected to different fasting/re-feeding cycles. The aim is to evaluate the potential of this new protocol as a study model for hepatic steatosis in Mulard ducks without force-feeding.

The first protocol established the kinetics of liver weight changes following a 1-hour meal after a 23-hour fasting period. Liver weight significantly increased up to 12 hours after the re-feeding phase and then decreased to its initial level 24 hours later. In a second protocol, a second re-feeding phase was implemented 12 hours after the first. Liver weight and glycogen percentage significantly increased after both re-feeding phases and returned to initial levels 24 hours after the last meal. Concurrently, the total lipid percentage did not increase after the initial 23-hour fasting followed by the first re-feeding phase but increased only after the second re-feeding phase (12 hours after the first meal), reaching its peak 24 hours after the second meal.

This study thus measured an increase in hepatic lipid levels after two voluntary meals in Mule ducks, suggesting that this protocol could be a promising model for studying hepatic steatosis without force-feeding.

INTRODUCTION

Afin de développer des méthodes efficaces visant l'arrêt de la pratique du gavage il est important de comprendre les mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la production de lipides au niveau du foie chez les canards. La mise en place d'un nouveau modèle expérimental sans gavage pour l'étude des mécanismes impliqués dans la stéatose hépatique représente déjà un premier pas important dans l'amélioration du bien-être animal, au moins lors des phases expérimentales.

Une récente étude s'est intéressée à l'impact d'un jeûne suivi d'une réalimentation volontaire dans le but d'étudier l'activation des voies métaboliques impliquées dans la synthèse de lipides hépatiques chez le canard mulard sans passer par le gavage (Andrieux et al., 2023). Des modifications en termes de structures, de composition et d'expressions génétiques au niveau du foie similaires à celles observées après un repas ou une période de gavage avaient pu être mesurées (Andrieux et al., 2023). Cependant, malgré une activation des voies métaboliques impliquées dans le stockage des lipides hépatiques, le pourcentage en lipides totaux dans les foies n'avait pas augmenté 4h après le repas. Dans l'objectif d'utiliser ce protocole en tant que modèle d'étude de la stéatose hépatique, il est indispensable de mesurer une hausse significative du stockage lipidique hépatique. C'est pourquoi une nouvelle étude a été réalisée dans le but d'optimiser ce précédent protocole afin de mesurer un stockage lipidique significatif.

Notre premier objectif était donc de prolonger les mesures de poids de foie après la prise alimentaire suivant la période de jeûne afin d'évaluer la persistance dans le temps du stockage énergétique induit, ce que nous avons effectué lors de la première expérience. Lors d'une seconde expérience, nous avons proposé un second repas volontaire 12h après le premier afin d'induire un stockage énergétique plus important au niveau du foie. Des prélèvements et des pesées de foies ont été réalisés au cours des deux manipulations pour estimer le stockage énergétique, et les compositions énergétiques ont été analysées uniquement lors de la seconde expérience.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Approbation de l'éthique

Toutes les manipulations réalisées sur des animaux vivants ont été validées par le comité d'éthique du Grand Sud-Ouest (n°73) et ont obtenu l'autorisation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous le numéro APAFIS #38020-2022071412046285 v3. Les expérimentations ont été réalisées dans la station expérimentale des palmipèdes à foie gras située à Benquet (UEPFG,

INRAE, Artiguères, Benquet, 40280 ; accréditation n° B40-037-1).

1.2. Animaux et prélèvements

Lors de la première expérimentation, 49 canards mulards mâles âgés de 8 semaines initialement nourris à volonté ont été élevés dans une même loge et ont subi 1 jeûne de 23h (avec accès à l'eau à volonté) pour le premier lot abattu ou 5 cycles de 23h de jeûne/1h de réalimentation. Des prélèvements ont été réalisés deux jours avant la première mise à jeun (ad-lib), à la fin de la première mise à jeun (H0) et 6h, 12h et 24h après la cinquième réalimentation (H6, H12 et H24).

Lors de la seconde manipulation 96 canards mulards mâles âgés de 8 semaines initialement nourris à volonté ont également subi 5 cycles de jeûne et de réalimentation (23 heures de jeûne et 1h de réalimentation pendant 5 jours). Les animaux ont été séparés dans deux loges distinctes (60 animaux dans la loge 1 et 36 animaux dans la loge 2). Pour cette expérimentation, 12 animaux de la première loge ont été euthanasiés avant la 5ème phase de réalimentation (H0), puis 3h, 6h, 9h et 12h après le début de l'heure de réalimentation (H3, H6, H9, H12). Les animaux de la seconde loge ont été nourris une 6ème fois 12h après la cinquième phase de réalimentation. 12 animaux ont ensuite été euthanasiés 6h, 12h et 24h après ce dernier repas (H18, H24, H36). Pour chaque condition les animaux ont été pesés puis euthanasiés par saignées après un étourdissement par choc électrique. Pour les différentes conditions, les foies entiers des 12 animaux ont été prélevés ainsi que du plasma. Les foies ont été stockés à -80°C jusqu'à analyse tandis que les plasmas ont été conservés à -20°C après centrifugation et séparation (2000 g, 10 minutes, 4°C).

Au cours des deux manipulations les animaux ont été nourris avec un aliment de croissance (PAG 1320, SOAL, Haut-Mauco, France ; matière sèche 87,7%, glucides 46,5%, protéines 15% et lipides 2,1%). Les prises alimentaires pour l'ensemble des repas ont été déterminées à partir de la différence entre le poids des gamelles avant et celui après la mise à disposition aux animaux.

1.3. Mesure de la composition énergétique du foie

Les lipides totaux ont été extraits à partir de 5g de foies broyés à l'aide d'un homogénéiseur ultraturax dans un mélange de dichlorométhane/méthanol (2:1). Les lipides totaux ont été quantifiés selon la méthode de Folch (Folch et al., 1957).

La mesure du glycogène dans les foies a été réalisée à partir de 150 mg de tissus hépatique. Le glucose libre est déterminé à partir de l'homogénéisation de tissus hépatiques dans de l'acide chlorhydrique (HCL; 1N). Le glycogène contenu dans les tissus hépatiques est hydrolysé par chauffage à 100°C dans une solution de

HCL durant 2h30. Le glucose libre (avant hydrolyse) et le glucose total (après hydrolyse) sont déterminés par dosage à l'aide d'un kit enzymatique (Glucose GOD-POD, Sobioda). La quantité de glycogène dans les tissus est déterminée à partir de la différence entre le glucose total et le glucose libre.

1.4. Analyses statistiques

Les données obtenues lors des différentes analyses ont été analysées à l'aide du logiciel R et de l'interface Rstudio. Dans un premier temps les valeurs aberrantes ($\alpha > 0.05$) ont été déterminées à l'aide d'un test de Grubbs avant d'être retirées. La normalité des données ainsi que leur homoscedasticité ont été déterminées pour chaque groupe à l'aide d'un test de Shapiro et d'un test de Bartlett respectivement. Si ces deux paramètres étaient respectés alors une Anova une voie ainsi qu'un test de Tukey post hoc ont été appliqués. Dans le cas où les données ne respectaient pas les conditions d'application alors un test de Kruskal-Wallis ainsi qu'un test post hoc de Dunn ont été appliqués.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 L'hyperphagie volontaire après un jeûne nécessite une période d'apprentissage

Lorsque les animaux ont un accès non restreint à l'alimentation ils ne développent pas de comportement hyperphagique. En effet, il a été montré que lorsque des canards âgés de 7 semaines ont un accès illimité à l'alimentation, ceux-ci s'alimentent entre 10 et 20 fois par jour en petite quantité (environ 25 g par repas) (Bley and Bessei, 2008). La restriction alimentaire (accès à l'alimentation 1h par jour) est classiquement appliquée lors de la période de préparation au gavage pour habituer les animaux (et leur jabot) à consommer une grande quantité d'aliment sur une courte période de temps (CIFO, 2014).

Dans une première expérience, un lot de canards mulard âgés de 8 semaines a donc été soumis à un jeûne de 23 h, puis un repas leur a été proposé pendant une heure dans l'objectif de mesurer l'évolution du poids des foies sur une durée de 24 h. Après avoir prélevé les lots d'animaux correspondant aux animaux nourris ad libitum et aux animaux mis à jeun pendant 23 h, nous avons mesuré la consommation des animaux renourris. De façon surprenante, après 23 h de jeûne les canards n'avaient consommé que 51,6 g d'aliment en moyenne. Cette observation nous a incité à répéter ces phases de jeûne / réalimentation, afin de les habituer au protocole et d'induire ainsi une plus forte consommation. Les animaux restants ont donc été soumis à une série de 5 jeûnes (23 h) suivis d'une heure de réalimentation. Nous avons pu observer que la quantité d'aliments ingérée était croissante de la première à la cinquième

phase de réalimentation (passant de 51,6 g à 606,9 g en moyenne). Ces résultats suggèrent que les animaux ont besoin d'une période d'apprentissage pour acquérir un comportement hyperphagique les conduisant à dépasser leurs besoins quotidiens (250 à 300 g en moyenne par jour et par canard à l'âge de 7 semaines) (Bley and Bessei, 2008).

2.2 Stockage et remobilisation des réserves énergétiques après une seule réalimentation volontaire précédée d'un jeûne de 23h

Afin de déterminer une cinétique de stockage et de mobilisation des réserves énergétiques du foie après ce 5ème repas volontaire, les poids de foies ont été pesés lorsque les animaux avaient accès à l'aliment à volonté (ad-lib), à la fin du premier jeûne (H0), puis 6 h, 12 h et 24 h après le cinquième repas (figure 1A). Il est intéressant de noter qu'aucune différence significative de poids de foie n'est observable entre les animaux nourris à volonté (ad-lib) et les animaux ayant subi un jeûne de 23h (H0). Il aurait pu être attendu une diminution du poids des foies témoignant d'une remobilisation des réserves dans le but de combler les besoins énergétiques provoqués par la mise à jeun comme précédemment observé chez le rat (Palou et al., 2008). Ces résultats obtenus chez le canard pourraient donc témoigner de deux choses : soit de l'absence de réserves énergétiques dans le foie lorsque les animaux sont alimentés à volonté (avec des petits repas espacés de 2h en moyenne) soit de la présence de réserves énergétiques suffisamment importantes pour faire face à des jeûnes prolongés sans affecter le poids de foie ni le métabolisme énergétique.

La cinquième réalimentation a toutefois entraîné une hausse du poids des foies significative jusqu'à 12h après le repas (H12) avec une moyenne de $127,9 \pm 13,03$ g contre $78,1 \pm 10,31$ g en moyenne pour H0. Ces résultats suggèrent que l'ingestion de cette grande quantité d'aliment (606,9 g en moyenne) entraîne une accumulation de réserves énergétiques dans le foie, maintenue jusqu'à 12h après un repas. Le poids de foie diminue ensuite jusqu'à atteindre une moyenne non différente de H0 ($67,2 \pm 8,75$ g) à H24, suggérant une remobilisation de ces réserves énergétiques.

2.3 Stockage et remobilisation des réserves énergétiques après deux réalimentations volontaires espacées de 12 h

L'observation d'un poids de foie élevé maintenu jusque 12 h après ce cinquième repas nous a incité à proposer un sixième repas de réalimentation à ce moment précis, dans l'objectif de favoriser une accumulation de réserves énergétiques sous forme lipidique.

Lors de cette seconde manipulation les prises alimentaires des animaux ont été mesurées pour

chaque phase de réalimentation. Lors de leur cinquième repas, les animaux de la loge 1 et de loge 2 ont consommé respectivement 218,14 g et 382 g en moyenne. Cette différence de consommation pourrait s'expliquer en partie par la différence du nombre d'animaux présents dans les deux loges (60 animaux pour la loge 1 ; 36 animaux pour la loge 2). De plus, ces résultats sont bien inférieurs aux observations réalisées lors de la première manipulation (606,9g en moyenne, avec 30 animaux dans la loge), mais restent toutefois supérieurs à un repas en condition *ad libitum* (Bley and Bessei, 2008). Le cinquième repas a induit une hausse de poids de foie significative jusque 9 h après l'ingestion (figure 1B). Cette différence avec la première expérience (hausse de poids de foie significative jusque 12 h après le repas) peut s'expliquer par une prise alimentaire plus faible, entraînant donc un stockage énergétique plus faible et donc plus rapidement mobilisable après le repas. La prise du 6ème repas 12 h après le cinquième, malgré une consommation moins importante (152,61 g en moyenne) a de nouveau entraîné une hausse de poids de foies atteignant une moyenne de $161,5 \pm 21,57$ g 6h après l'ingestion (H18), soit environ 40 g de plus que le poids mesuré à H6 (différence non significative). Ces résultats semblent confirmer l'induction d'une accumulation de réserves énergétiques induite par une nouvelle prise alimentaire survenant avant la remobilisation des réserves pré existantes. 24 h après cette dernière réalimentation (H36), les poids de foies redescendent au niveau initial. La nouvelle phase de réalimentation appliquée 12h après la cinquième réalimentation a ainsi permis un stockage énergétique important dont le pic a été mesuré 6h après le sixième repas.

2.4 Composition des réserves énergétiques hépatiques induites par des réalimentations espacées de différents temps de jeûne

Les pourcentages en lipides totaux et en glycogène hépatique ont été déterminés pour chacune des conditions de la seconde manipulation (figure 2). Le taux de glycogène hépatique (figure 2A) suit la même évolution que le poids de foie, avec un pic 9 h après la cinquième réalimentation (H9), et 6 h après la sixième réalimentation (H18) passant de $5,67 \pm 1,16$

% (H0) à $10,94 \pm 1,86$ % (H9) confirmant les résultats de la précédente étude (Andrieux et al., 2023), puis à $15,22 \pm 1,03$ % (H18). A H12, le pourcentage de glycogène passe à $9,48 \pm 4,95$ %, suggérant un début de remobilisation 12 h après le repas. Il est intéressant de noter qu'il existe une plus grande variabilité dans les résultats de la condition H12 que pour n'importe quelle autre condition (écart type de 4,95 contre 1,86 pour H9). Cette variabilité peut suggérer une différence entre les individus concernant le début de la remobilisation des réserves énergétiques, probablement en lien avec la consommation alimentaire individuelle que nous n'avons pas pu mesurer. Le taux de glycogène diminue ensuite progressivement jusqu'à atteindre la moyenne de $2,09 \pm 1,91$ % après 24 h de jeûne (H36). Ces résultats révèlent la persistance du stockage énergétique sous forme de glycogène jusqu'à 6h après le sixième repas puis une remobilisation totale de cette forme énergétique au bout de 24 h de jeûne.

Les lipides totaux hépatiques suivent une dynamique très différente du glycogène (figure 2B), avec un taux moyen stable durant toute la première phase, et une hausse progressive uniquement après le sixième repas, survenant 12 h après le cinquième. De façon intéressante, le taux maximal de lipides hépatiques est mesuré 24 h après le sixième repas ($8,36 \pm 1,38$ % à H36 contre $3,48 \pm 0,72$ à H0), lorsque le poids de foie et le taux de glycogène sont à leur niveau minimal.

Ces résultats confirment donc que le glycogène est une forme énergétique rapidement mise en place et rapidement mobilisable, tandis que les lipides de stockage représentent une forme de stockage secondaire mobilisable à plus long terme.

CONCLUSION

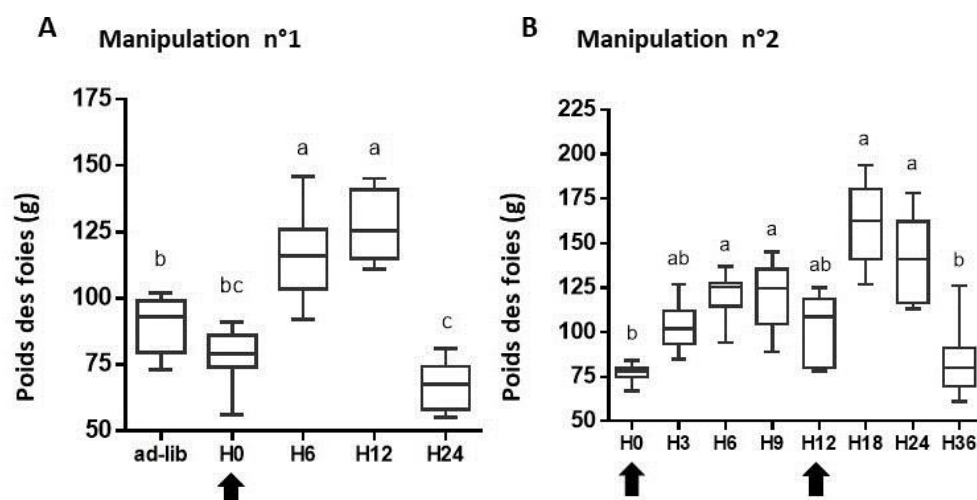
Nous avons donc montré qu'il est possible d'induire un stockage énergétique sous forme de lipides dans le foie de canards mulard en seulement deux repas volontaires. Le protocole de jeûne / réalimentation ainsi optimisé pourrait donc permettre d'étudier le métabolisme hépatique du canard mulard sans avoir à gaver les animaux. Par ailleurs, ces résultats ouvrent également de nouvelles perspectives pour un engraissement naturel des foies de canard.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andrieux, C., et al. 2023. Fasting/refeeding: an experimental model to study the impact of early thermal manipulation on hepatic metabolism in mule ducks. *AJP-Reg. Integ. Comp. Phys.* 324, R45–R57. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00158.2022>
- Bley, T.A.G., Bessei, W., 2008. Recording of Individual Feed Intake and Feeding Behavior of Pekin Ducks Kept in Groups. *Poultry Science* 87, 215–221. <https://doi.org/10.3382/ps.2006-00446>
- CIFOG, 2014. Elevage des Oies & Canards : La Phase d'Elevage.
- Folch, J., et al. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.

Palou, M., *et al.* 2008. Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 456, 825–836.
<https://doi.org/10.1007/s00424-008-0461-1>

Figure 1. Evolution des poids des foies en fonction des mises à jeun et des réalimentations pour la manipulation (A) et la manipulation 2 (B)

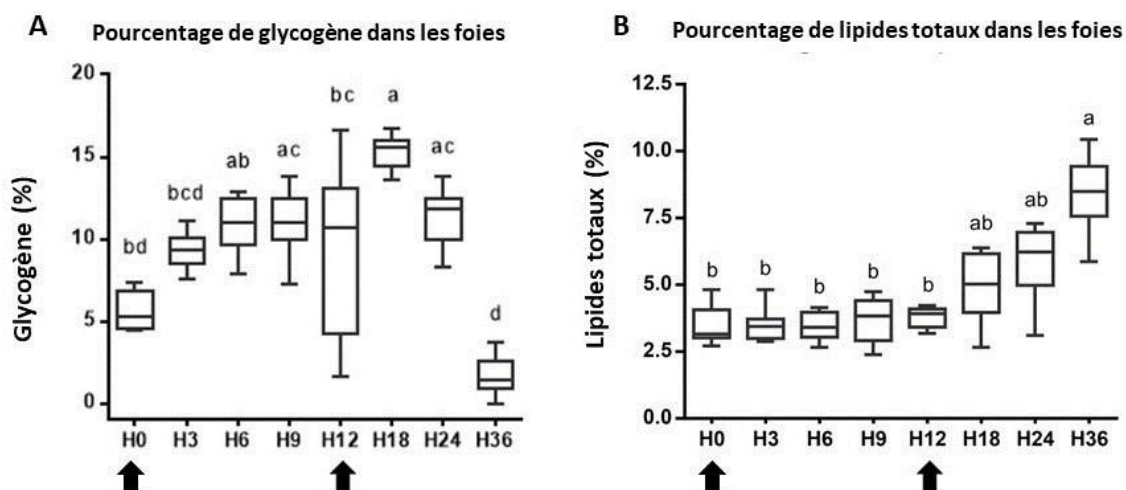


Les poids des foies ont été mesurés pour la première manipulation (A) sur des animaux nourris à volonté (ad lib), mis à jeun depuis 23 h (H0) puis euthanasiés 6 h, 12 h et 24 h après la cinquième réalimentation (première flèche noire). Pour la seconde manipulation (B), les poids de foie ont été mesurés à la fin du jeûne (H0) puis 3 h, 6 h, 9 h, et 12 h, après la cinquième réalimentation (H3, H6, H9 et H12), puis 6 h, 12 h et 24 h après la sixième réalimentation symbolisée par la seconde flèche noire (H18, H24 et H36).

Une ANOVA à une voie a été réalisée pour comparer les données de la manipulation n°1 et un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour la manipulation n°2.

Si une boîte à moustache possède une lettre en commun avec une autre, cela signifie qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux conditions (P-value < 0,05).

Figure 2 : Compositions énergétiques des foies en glycogène (A) et en lipides totaux (B) au cours de la seconde manipulation.



Pour la première manipulation (A) les conditions d'applications des tests paramétriques ont été validées, une Anova une voie ainsi qu'un test post-hoc de Tukey ont été appliqués (n=9 pour ad-lib, n=10 pour H0, H6, H12, H24). Pour la seconde manipulation (B), les conditions d'application n'ont pas été respectées, un Kruskal-Wallis ainsi qu'un test post-hoc de Dunn ont été appliqués (n=12 pour toutes les conditions). Si une boîte à moustache possède une lettre en commun avec une autre, cela signifie qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux conditions (P-value > 0,05). Les flèches représentent les débuts des phases de réalimentation de 1h.