

EFFETS A COURT ET LONG TERMES DE LA MANIPULATION THERMIQUE EMBRYONNAIRE SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA CAILLE JAPONAISE

Vitorino Carvalho Anaïs ¹, Hennequet-Antier Christelle ¹, Couroussé Nathalie ¹,
Brionne Aurélien ¹, Gimmonnet Coralie ¹, Crochet Sabine ¹, Bordeau Thierry ¹, Darras
Veerle M. ³, Collin Anne ¹, Coustham Vincent ¹

¹BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

³Laboratory of Comparative Endocrinology, Department of Biology, KU Leuven, B-3000
Leuven, Belgium

vincent.coustham@inra.fr

RÉSUMÉ

Des changements environnementaux durant l'embryogenèse peuvent avoir des répercussions sur le développement ultérieur et le phénotype de l'individu. Dans ce contexte, il a été montré que les poulets thermo-manipulés pendant la période d'incubation (du jour 7 à 16) présentent une tolérance plus importante à la chaleur à l'âge adulte. Chez la caille, la thermo-manipulation (TM) reste peu étudiée et l'acquisition potentielle d'une telle résistance n'a jamais été testée. Ainsi, nous avons développé un modèle de TM chez la caille japonaise (*Cortunix japonica*) et analysé les effets à court et long termes sur le développement et la physiologie des animaux. La résistance des animaux à la chaleur a également été testée par un challenge thermique à 35 jours d'âge (36°C pendant 7h). La TM induit une diminution du taux d'éclosion et une augmentation de la mortalité au cours des quatre premières semaines de vie. Ce traitement impacte significativement la croissance des cailles de l'éclosion jusqu'à 25 jours de vie. Bien que le coup de chaleur ait été perçu par les animaux (augmentation de la température interne), aucune gêne (hyperventilation, prostration, etc.) n'est observée dans les groupes contrôle et TM. Aucun impact du traitement embryonnaire et du coup de chaleur n'est observable après 35 jours de vie post-éclosion. L'analyse de nombreux paramètres physiologiques (comme la température ou les niveaux des métabolites sanguins) est actuellement en cours et permettra certainement de mieux comprendre l'impact de la TM sur la résistance des cailles face à une exposition à la chaleur aiguë.

ABSTRACT

Short and long-term effects of embryonic thermal manipulation on Japanese quail physiology

In vertebrates, the embryonic environment is known to affect the development and health of the new born and/or adult individuals. In chickens, the thermal-manipulation (TM) of eggs during the incubation period was associated with the improvement of the heat-tolerance of animals. However, little is known for quail. Therefore we investigated the impact of TM in quail by analyzing its short and long-term effects on zootechnical, physiological and metabolic parameters. Heat-tolerance was tested by a heat challenge (36°C for 7h) at 35 days of age. TM significantly reduced the hatching rate of treated animals and increased mortality during the first four weeks of life. Moreover, a significant increase of weight at hatching followed by a significant decrease at 25 days of age was observed in TM quails (males and females). After 35 days of age, no impact of TM or heat challenge treatments was observed. Numerous physiological parameters (including temperature and metabolites levels in blood) are currently investigated. Altogether, these data will give us new insights about the TM impact of the quail heat tolerance.

INTRODUCTION

Chez les vertébrés, l'environnement embryonnaire est connu pour avoir des impacts à long terme sur le développement et la santé des individus. Dans ce contexte, il a été montré que des traitements embryonnaires consistant en l'augmentation cyclique de la température d'incubation (TM) induisaient une tolérance plus importante à la chaleur chez les poulets adultes (Piestun *et al.*, 2008; Piestun *et al.*, 2009; Loyau *et al.*, 2013; Loyau *et al.*, 2015). Cette augmentation de la tolérance est associée à des modifications physiologiques, métaboliques et d'expression génique (Piestun, *et al.*, 2008; Piestun, *et al.*, 2008; Piestun *et al.*, 2009; Loyau, *et al.*, 2014; Loyau *et al.*, 2015, 2016; Piestun, *et al.*, 2015).

Cependant, le poulet n'est pas la seule espèce aviaire de rente soumise aux fortes variations de température. Chez la caille japonaise (*Cortunix japonica*), des protocoles de TM de courte durée ont été décrits (Hemid *et al.*, 2010; Alkan *et al.*, 2013) mais l'acquisition d'une tolérance potentielle à la chaleur n'a jamais été testée. Ainsi, en nous basant sur les données et les protocoles décrits chez le poulet, nous avons développé un protocole de TM chez la caille. Nous avons ensuite analysé les impacts à court et long termes sur le développement des animaux et évalué la tolérance des animaux en cas d'exposition thermique aiguë.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocole expérimental

Ce protocole expérimental a été approuvé par le Ministère de l'Education Nationale et le comité d'éthique Val-de-Loire (N° APAFIS#4606-201603111363124). Il a été conduit au sein de l'unité expérimentale INRA UE1295 PEAT (agrément n°C37-175-1).

Les œufs de 80 cailles de lignée fortement consanguine INRA Cons DD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN03989050>) sont collectés pendant 12 jours et conservés à 16°C jusqu'à l'incubation. Les œufs issus de mêmes parents sont séparés de façon homogène entre les deux traitements. Dans le traitement contrôle (C), les œufs sont maintenus à 37,8°C et 56% d'humidité relative durant toute l'incubation. Dans le traitement de thermo-manipulation embryonnaire (TM), les œufs sont incubés à 39,5°C et 65% d'humidité relative depuis la mise en incubation jusqu'au jour 13 d'incubation. L'incubation des animaux C a commencé 8h avant celle des animaux TM afin de synchroniser l'éclosion. Les œufs sont inclinés de 90° toutes les heures. A l'éclosion, toutes les cailles sont élevées en groupe dans un même parquet, à 40°C. La température d'élevage est graduellement réduite jusqu'à atteindre 20°C au 23^{ème} jour de vie et est maintenue à 20°C tout le reste de l'expérimentation.

Durant toute la période d'élevage, l'état sanitaire et la mortalité sont relevés plusieurs fois par jour. De plus, durant toute la période d'élevage et d'expérimentation, les animaux ont accès à de l'eau et à de la nourriture *ad libitum*. En plus de la pesée à l'éclosion, la masse des cailles est mesurée au jour 25 et un sexage phénotypique est effectué ce même jour. Au jour 35, 36 animaux C femelles, 25 animaux TM femelles, 36 animaux C mâles et 29 animaux TM mâles subissent un coup de chaleur (CC), consistant en une exposition des animaux à 36°C pendant 7h. Ces animaux sont alors nommés C-CC (contrôles-coup de chaleur) et TM-CC (thermo-manipulés-coup de chaleur). Les animaux n'ayant pas subi de CC sont eux nommés C-C (contrôles-contrôles) et TM-C (thermo-manipulés-contrôles). A l'issue du CC et durant les semaines suivantes, les animaux sont pesés (jour 35, semaine 7, 13 et 17 pour les femelles ; jour 35, semaine 8 pour les mâles).

1.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (version 3.5.1).

1.4.1. Analyse du taux d'éclosion et de la mortalité

L'impact de la TM sur le taux d'éclosion et la mortalité est analysé grâce à un test Chi2. Au total, 689 œufs et 479 cailles sont inclus respectivement dans l'analyse du taux d'éclosion et de la mortalité entre l'éclosion et le 28^{ème} jour de vie post-éclosion.

1.4.2. Analyse de la masse

Dans un premier temps, l'impact du sexe, du temps, du traitement TM et des interactions sur la masse des cailles est étudié depuis leur éclosion jusqu'au jour 35 sur 140 C (72 femelles et 68 mâles) et 127 TM (60 femelles and 67 mâles). Puis l'impact du temps, du traitement TM, du coup de chaleur et des interactions sur la masse des cailles est analysé suite au coup de chaleur soit après le 35^{ème} jour de vie, sur les femelles (36 C-C, 36 C-CC, 35 TM-C, 25 TM-CC) et sur les mâles (28 C-C, 26 C-CC, 38 TM-C, 29 TM-CC) de façon indépendante. Ces deux analyses sont menées grâce à un modèle linéaire mixte (paquet nlme version 3.1-137). Ces modèles contiennent deux effets aléatoires, le couple parental et l'animal au sein du couple. De plus, la structure de la variance-covariance est modélisée par une fonction puissance des valeurs prédites pour prendre en compte l'hétéroscédasticité des erreurs. Les effets sont estimés par la méthode du maximum de vraisemblance restreint (REML). Les effets du temps et de la TM sont testés au sein de chaque sexe.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La TM embryonnaire est une stratégie permettant l'acquisition de la tolérance des poulets à de fortes augmentations de la température ambiante (Piestun, *et al.*, 2008; Loyau *et al.*, 2015). Cependant, les poulets ne sont pas la seule espèce aviaire de rente à être touchée par les variations climatiques et les

informations concernant l'utilisation de la TM chez d'autres espèces aviaires, notamment la caille, restent très fragmentaires (Abd El-Gawad *et al.*, 2008; Hemid *et al.*, 2010; El-Daly *et al.*, 2013). Aussi nous avons développé un modèle de TM s'appliquant dès le début jusqu'au jour 13 de l'incubation chez la caille japonaise (Figure 1) et analysé l'impact de ce traitement sur la physiologie et le développement de l'animal de l'éclosion jusqu'au 35^{ème} jour de vie.

2.1 La TM dès le début de l'incubation impacte négativement la survie des individus

Le premier paramètre que nous avons analysé est l'impact de la TM sur le taux d'éclosion ainsi que sur la survie des individus au cours des 28 premiers jours de vie post-éclosion (jamais étudiée jusqu'à présent). Dans les deux cas, la TM présente un impact négatif significatif sur ces deux paramètres, respectivement $p < 0.05$ et $p < 0.001$ (Figure 2). Ces travaux sont les premiers à référencer un tel effet de la TM sur la survie des oiseaux (Alkan *et al.*, 2013; Piestun *et al.*, 2015) sauf lorsque le traitement est appliqué de façon continue au cours de la journée (soit 24h/jour, Piestun *et al.*, 2009). Ces différences peuvent principalement être dues à la longueur du traitement et/ou à la fenêtre d'application. En effet, les études précédentes chez la caille ne concernent que des traitements relativement courts (trois jours de TM au début ou à la fin de l'incubation, Alkan *et al.*, 2013) et les études chez le poulet ont montré que la fenêtre d'application du traitement durant l'embryogenèse est un paramètre déterminant pour l'efficacité de la TM sur la physiologie de l'individu (Yahav *et al.*, 2004; Collin *et al.*, 2007; Piestun *et al.*, 2009; Loyau *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant d'effectuer des TM sur des fenêtres variables afin de définir un traitement n'impactant pas négativement la survie des animaux.

2.2 La TM influence la croissance des cailles durant le premier mois de vie

Afin d'estimer la croissance des animaux, nous avons récolté leurs masses à différents temps de développement : à l'éclosion (jour 1), à 25 jours de vie et au 35^{ème} jour de vie (Figure 3). L'analyse statistique globale confirme l'impact attendu du temps, correspondant à l'âge des animaux ($P < 0.001$) et révèle un effet du traitement embryonnaire ($P < 0.05$) sur la masse. De plus, l'analyse des contrastes met en évidence une masse à l'éclosion plus importante chez les TM mais plus faible après 25 jours de vie (mâles et femelles) que chez les contrôles. A 35 jours de vie, l'impact du traitement embryonnaire n'est plus observable. Les autres modèles de TM chez la caille n'induisent pas de modification de masse des animaux à l'éclosion (Alkan *et al.*, 2013) tout comme chez le poulet (Loyau *et al.*, 2015). Chez la dinde, la TM induit l'augmentation de la masse embryonnaire juste avant l'éclosion mais pas à l'éclosion (Piestun *et al.*, 2015). Ainsi l'effet de la TM sur la croissance semble

dépendre de l'espèce et du modèle de TM considérés. Cependant, il est à noter que dans notre modèle nous synchronisons l'éclosion des animaux contrôles et des animaux TM. En effet, sans synchronisation, les cailles TM éclosent plus tôt que les cailles C (d'environ 8 heures) comme cela a été précédemment observé chez la dinde (Piestun *et al.*, 2015). Ainsi, dans les modèles de TM non synchronisés, ces absences d'impact de la TM sur la masse des animaux à l'éclosion pourraient être dues à une perte de masse collectée plus tard par rapport à l'éclosion chez les animaux TM éclos plus tôt que les C. Cet impact de la TM sur la masse à l'éclosion des animaux pourrait marquer un effet sur le développement et la croissance embryonnaire, et de ce fait sur le métabolisme embryonnaire des individus comme précédemment suggéré chez la dinde (Piestun *et al.*, 2015). Un suivi du développement embryonnaire pendant et après la TM serait ainsi très informatif.

2.3 Ni la TM ni le CC n'impactent la croissance des cailles après 35 jours de vie

Au cours de l'application du CC aucune modification du comportement n'est observable, nous permettant de conclure que ce CC (36°C pendant 7h) n'induit aucun mal-être chez les animaux (hyperventilation, prostration, etc.). A la suite de ce CC, aucun impact sur la masse des animaux n'est observable ($p > 0.05$, Figure 4). Au cours des semaines suivantes, aucun impact de la TM ou du CC n'est observable sur la croissance des individus. Durant cette même période, aucune modification de la prise alimentaire n'est détectée (données non montrées). Ainsi l'impact de la TM sur la masse des animaux est uniquement observable durant le premier mois de vie des cailles. Ces données sont en contradiction avec les données précédemment publiées mettant en évidence une augmentation de la masse des cailles TM au 42^{ème} jour de vie (Hemid *et al.*, 2010). Cependant, l'une des hypothèses concernant ces différentes observations serait liée au fait que les TM auxquels sont soumises les cailles diffèrent également. Il serait intéressant d'analyser l'impact de ces traitements sur d'autres paramètres zootechniques comme la ponte ou la croissance musculaire.

3. CONCLUSION

En conclusion, ces données mettent en évidence des impacts à court et long termes de la TM chez la caille japonaise, avec notamment des effets sur la survie des animaux de l'éclosion au 28 premier jours de vie et des modifications de la croissance des animaux au cours du premier mois de vie. Des données physiologiques (comme la température ou les niveaux sanguins de métabolites) sont actuellement en cours d'analyse afin de mieux caractériser l'impact de la TM sur la physiologie des cailles et la réponse des animaux face à une exposition thermique aiguë. De plus, des analyses moléculaires seront nécessaires afin

de comprendre les mécanismes moléculaires liés à la réponse physiologique des cailles à la TM.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Tatiana Zerjal pour la lignée de caille ConsDD, Romuald Rouger et Desnoues Benoît (SYSAF, INRA, 37380 Nouzilly, France) pour leur investissement dans la sélection des animaux. Ce projet est financé par le projet ANR JCJC “QuailHeatE” [ANR-15-CE02-0009-01].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Gawad, A. E. A., El-Wardany, I., El-Daly, E. F., Abd El-Azeem, N. A. and Hemid, A. H. (2008) *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(5), pp. 605–611.
- Alkan, T., Karabag, K., Galic, A., Balcioglu, M. . and S, K. (2013) *Archiv Tierzucht*, 56(78), pp. 789–796.
- Collin, A., Berri, C., Tesseraud, S., Rodon, F. E., Skiba-Cassy, S., Crochet, S., Duclos, M. J., Rideau, N., Tona, K., Buyse, J., Bruggeman, V., Decuypere, E., Picard, M. and Yahav, S. (2007) *Poult Sci*, 86(5), pp. 795–800.
- El-Daly, E. F., El-Wardany, I., El-Gawad, A. H. A., Hemid, A. E. A. and El-Azeem, N. A. A. (2013) *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(1), pp. 207–216.
- Hemid, A. H., El- Wardany, I., El-Dalyand, E. F., Abd El-Azeem, N. A. and El-Gawad, A. (2010) *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(5), pp. 517–524.
- Loyau, T., Bedrani, L., Berri, C., Metayer-Coustard, S., Praud, C., Coustham, V., Mignon-Grasteau, S., Duclos, M. J., Tesseraud, S., Rideau, N., Hennequet-Antier, C., Everaert, N., Yahav, S. and Collin, A. (2015) *Animal*, 9(1), pp. 76–85.
- Loyau, T., Collin, A., Yenisey, C., Crochet, S., Siegel, P. B., Aksit, M. and Yalcin, S. (2014) *Poult Sci*, 93(8), pp. 2078–2086.
- Loyau, T., Hennequet-Antier, C., Coustham, V., Berri, C., Leduc, M., Crochet, S., Sannier, M., Duclos, M. J., Mignon-Grasteau, S., Tesseraud, S., Brionne, A., Metayer-Coustard, S., Moroldo, M., Lecardonnel, J., Martin, P., Lagarrigue, S., Yahav, S. and Collin, A. (2016) *BMC Genomics*, 17, p. 329.
- Loyau, T., Metayer-Coustard, S., Berri, C., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Sannier, M., Chartrin, P., Praud, C., Hennequet-Antier, C., Rideau, N., Courousse, N., Mignon-Grasteau, S., Everaert, N., Duclos, M. J., Yahav, S., Tesseraud, S. and Collin, A. (2014) *PLoS One*, 9(9),
- Piestun, Y., Harel, M., Barak, M., Yahav, S. and Halevy, O. (2009) *J Appl Physiol (1985)*, 106(1), pp. 233–240.
- Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J. and Yahav, S. (2008) *Poult Sci*, 87(8), pp. 1516–1525.
- Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O. and Yahav, S. (2008) *Journal of Thermal Biology*, 33(7), pp. 413–418.
- Piestun, Y., Zimmerman, I. and Yahav, S. (2015) *Poultry Science*, 94(2), pp. 273–280.
- Yahav, S., Collin A Fau - Shinder, D., Shinder D Fau - Picard, M., Picard, M. and Poult, S. (2004) *Poultry Science*, 83

Figure 1. Schéma du protocole de thermo-manipulation chez la caille japonaise

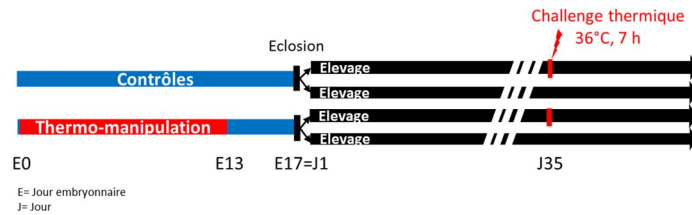


Figure 2. Impact de la thermo-manipulation embryonnaire sur les taux d'éclosion et de mortalité entre les jours 1 et 28 chez la caille japonaise. C : animaux contrôles TM : animaux thermo-manipulés. Les effectifs analysés sont indiqués au sein des histogrammes. * :p-valeur<0,05 *** :p-valeur<0,001

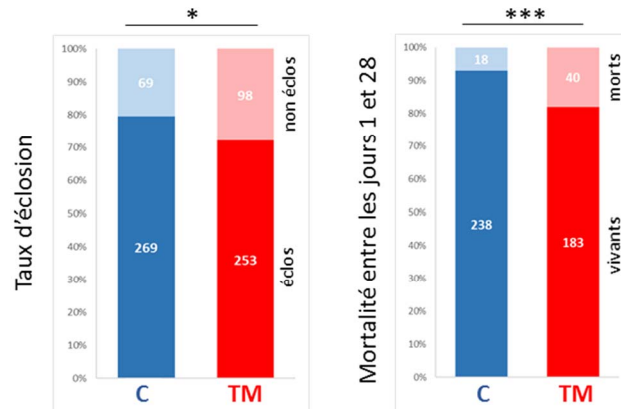


Figure 3. Impact de la thermo-manipulation embryonnaire sur l'évolution de la masse des individus entre l'éclosion (jour 1) et le 35^{ème} jour de vie. C : animaux contrôles TM : animaux thermo-manipulés. J25 : jour 25 de vie. * :p-valeur<0,05 ** :p-valeur<0,01 *** :p-valeur<0,001

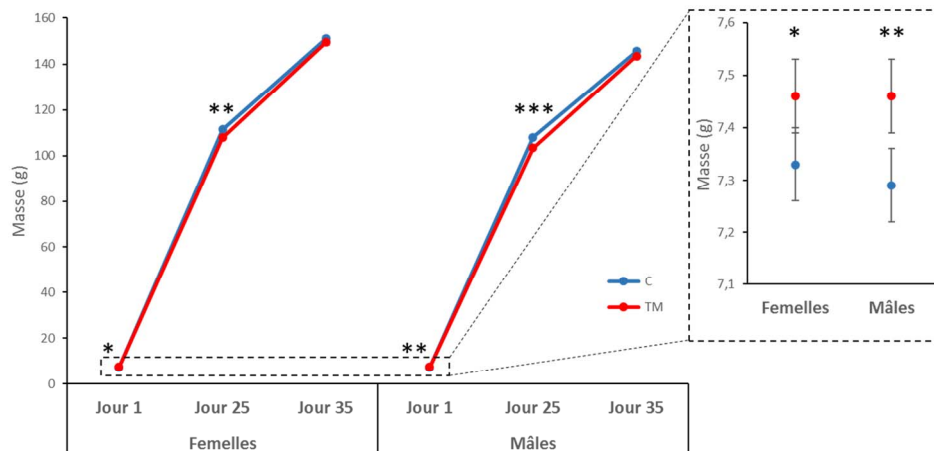


Figure 4. Impact de la thermo-manipulation embryonnaire et du coup de chaleur sur l'évolution de la masse à partir du 35^{ème} jour de vie chez les mâles et chez les femelles. C : animaux contrôles TM : animaux thermo-manipulés. CC : coup de chaleur (36°C pendant 7h). * :p-valeur<0,05 ** :p-valeur<0,01 *** :p-valeur<0,001

