

Développement foetal du porcelet en relation avec la survie à la naissance. Axe corticotrope et transcriptome surrénalien

Elena TERENINA (1), Sami YAMMINE (1), Laure GRESS (1), Nathalie IANNUCELLI (1), Christine LASCOR (1), Yannick LIPPI (2), Pascal MARTIN (2), Yvon BILLON (3), Yann LABRUNE (1), Magali SANCRISTOBAL (1), Laurianne CANARIO (1), Laurence LIAUBET (1), Pierre MORMÈDE (1)

(1) INRA, UMR444 Laboratoire de Génétique Cellulaire, F-31326 Castanet-Tolosan, France

(2) INRA, UMR1331 Toxicologie Alimentaire, F-31027 Toulouse, France

(3) INRA, UE967 Génétique Expérimentale en Productions Animales, F-17700 Surgères, France

elena.terenina@toulouse.inra.fr

Avec la collaboration de UE967 Génétique Expérimentale en Productions Animales, F-17700 Surgères, France

Foetal development in relationship with piglet survival at birth. Adrenocortical axis and adrenal transcriptome study.

Piglet mortality is a major source of economic loss to European pork production and a social and ethical problem related to animal welfare. The adrenocortical (HPA) axis is a major player in fetal maturation and in the genetic influences on piglet survival. Together with the autonomic nervous system it has a critical role in metabolic adjustments at birth. The aim of our project is to analyze genetic influences on the maturation of the fetus, based on 2 extreme breeds, Meishan (MS, high potential for piglet survival and hyperactive HPA axis) and Large White (LW, high incidence of piglet mortality and low activity of the HPA axis). In order to dissociate maternal and fetal contributions, MS and LW sows were inseminated with mixed sperm. Fetuses were delivered by caesarean section at 2 stages of gestation (90 or 110d). Blood was collected from cord artery and/or vein, and adrenal glands were sampled at necropsy.

Cortisol levels, measured by radioimmunoassay, were higher at 110d than at 90d ($P < 0.05$). After normalization and filtering, 43385 of the 61625 transcripts present on the Agilent pangenomic arrays were found to be expressed in the adrenal glands and 207 transcripts ($FDR < 5\%$) were significantly regulated with regard to the interaction between genotypes and gestational stages. The next step consists in exploring how the transcriptional regulation of the differentially expressed genes among the two fetal stages and the four genotypes may be related to maturity processes.

Grant ANR-2009-GENM-005 PORCINET

INTRODUCTION

L'augmentation substantielle de la mortalité des porcelets avant le sevrage est une préoccupation majeure en production porcine. La survie dépend à la fois des aptitudes maternelles et des caractéristiques propres au porcelet. La maturation des organes qui permettent la survie du porcelet après la naissance est notamment influencée par les glucocorticoïdes sécrétés par l'axe corticotrope (Leenhouwers *et al.*, 2002) qui joue un rôle majeur dans les régulations métaboliques et qui est au cœur de la réponse biologique de stress. Il intervient aussi avec le système nerveux autonome dans les adaptations métaboliques à la naissance (Mayor et Cuezva, 1985). De grandes différences fonctionnelles de l'activité corticotrope ont été observées entre les races porcines, et son contrôle génétique est bien établi (Mormède *et al.*, 2011). Les races porcines Meishan (MS) et Large White (LW), qui s'opposent sur de nombreux caractères (activité corticotrope, métabolisme énergétique et vitalité néo-natale) (Canario *et al.*, 2006) ont été utilisées dans notre étude afin de caractériser la maturation des fœtus, en relation avec la biologie de l'axe corticotrope et le transcriptome surrénalien afin de rechercher

des gènes candidats pour une utilisation ultérieure en sélection.

1. MATERIEL ET METHODES

Afin de pouvoir étudier la contribution respective du génotype de la mère et du fœtus, les truies Meishan et Large White ont été inséminées avec du sperme mélangé issu de ces deux races (INRA, Magneraud). La première portée (issue de 8 truies MS et de 5 truies LW) est née à terme par les voies naturelles et les fœtus de la deuxième portée (issus de 16 truies MS et de 16 truies LW) ont été obtenus par césarienne à 90 ou à 110 de gestation (6 à 10 truies par stade et par génotype).

Le sang artériel et le sang veineux ont été prélevés directement sur le cordon ombilical dans des tubes héparinés sur fœtus vivants ou le sang total du cordon sur les nouveau-nés. Les glandes surrénales ont été récupérées par dissection après euthanasie des fœtus, puis congelées.

Le cortisol plasmatique a été mesuré par dosage radioimmunologique. L'étude du transcriptome surrénalien a été réalisée par une approche pan-génomique (puce Agilent

PORCINET 60K) sur 64 fœtus (6-10 échantillons par type génétique et stade de gestation). Pour l'analyse du cortisol les échantillons de plasma de ces animaux ont été complétés par ceux des autres fœtus de ces mêmes portées.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (<http://www.cran.r-project.org>). Dans le modèle linéaire les facteurs suivants sont considérés : type génétique du fœtus ou nouveau-né (MS, LW, MSF1, LWF1), stade de gestation pour les fœtus (90j, 110j), leur interaction, ainsi que les effets maternels aléatoires (pour le cortisol). Les données transcriptomiques ont été corrigées pour la multiplicité des tests en utilisant la procédure de Benjamini-Hochberg au seuil de 5%.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Etude fonctionnelle de l'axe corticotrope

La comparaison des concentrations plasmatiques de cortisol entre le sang artériel et veineux des fœtus montre une corrélation élevée ($R = 0,94$; $n = 181$). Les dosages ont donc été réalisés en routine sur le sang artériel.

A 90 jours, les concentrations de cortisol sont faibles (environ 15 ng/ml) et ne diffèrent pas selon le type génétique du fœtus. A 110 jours, les concentrations sont plus élevées (environ 40 ng/ml, $P < 0,0001$) et une légère différence est observée entre types génétiques, la concentration en cortisol dans le sang artériel fœtal devenant alors plus élevée chez les porcelets MS purs que chez les F1 de mère MS ($P = 0,08$). Aucune différence génétique n'a été observée sur la teneur en cortisol plasmatique chez les nouveau-nés (Figure 1). Ces résultats montrent que la différence bien documentée du niveau de cortisol entre MS et LW survient en grande partie pendant la vie extra-utérine.

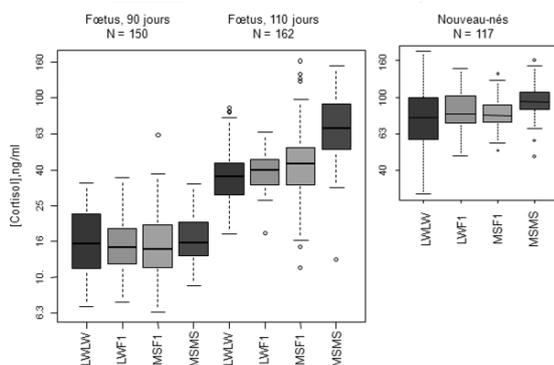


Figure 1 – Concentrations de cortisol dans le plasma artériel mesurées chez les fœtus LW et les fœtus MS purs et croisés à deux stades de gestation et chez les nouveau-nés

2.2. Etude du transcriptome surrénalien

Après normalisation, 43385 des 61625 transcrits (environ 72%) présents sur la puce Agilent sont trouvés exprimés dans les glandes surrénales en fin de gestation.

L'analyse en composantes principales des profils d'expression permet de distinguer clairement les groupes expérimentaux, avec l'axe 1 (expliquant 44 % de la variabilité) séparant les 2 stades de gestation et l'axe 2 (expliquant 30 % de la variabilité) séparant les groupes génétiques (Figure 2).

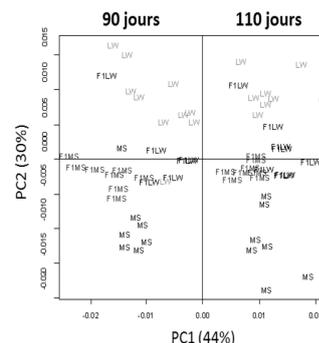


Figure 2 – Résultats de l'analyse en composantes principales effectuée sur l'ensemble des gènes différentiellement exprimés dans les glandes surrénales

L'analyse du transcriptome surrénalien montre que l'expression de 207 transcrits est significativement influencée par l'interaction entre le génotype et le stade de gestation. Parmi ceux-ci, nous avons mis en évidence un réseau de gènes différentiellement exprimés (NQO1, NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 ; CKM, creatine kinase, muscle ; ATIC, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/ IMP cyclohydrolase ; TPM1, tropomyosin 1 (alpha) ; CIDEA, cell death-inducing DFFA-like effector c) sous-exprimés à 90 jours (vs 110) et sous-exprimés chez les MS à 110 jours. Ces gènes sont en lien avec l'ubiquitine (UBC) qui a un rapport direct avec le SF-1, facteur de transcription ayant un rôle important dans le développement des gonades et du cortex surrénalien et dans la stéroïdogénèse. Il est considéré comme le principal régulateur de la transcription de l'axe HPA au cours du développement et dans les tissus adultes.

CONCLUSION

Notre étude apporte de nouvelles informations concernant le rôle de l'axe corticotrope dans les mécanismes génétiques contribuant à la maturation fœtale et a permis d'identifier des nouveaux gènes candidats potentiels pour caractériser ces mécanismes. L'étape suivante consiste à étudier les promoteurs dans les gènes différentiellement exprimés et à explorer les facteurs de transcription qui régulent leur expression en rapport avec la maturation.

Les études du métabolome plasmatique, du transcriptome de cinq tissus complémentaires et du protéome de deux tissus sont actuellement en cours. Ces données « omiques » nous permettront de mieux décrire la maturité et des différences entre les génotypes. Toutes ces informations devront être intégrées dans un modèle plus complet du fonctionnement de l'axe corticotrope en rapport avec la maturation fœtale, qui pourra aider à définir des stratégies de sélection génétique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Canario L., Cantoni E., Le Bihan E., Caritez J.C., Billon Y., Bidanel J.P., Foulley J.L., 2006. Between-breed variability of stillbirth and its relationship with sow and piglet characteristics. *J. Anim. Sci.*, 84, 3185-96.
- Leenhouwers JI, Knol EF, de Groot PN, Vos H, van der Lende T., 2002. Fetal development in the pig in relation to genetic merit for piglet survival. *J. Anim. Sci.*, 80, 1759-70.
- Mayor F., Cuezva J.M., 1985. Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. *Biol. Neonate*, 48, 185-96.
- Mormède P., Foury A., Barat P., Corcuff J.B., Terenina E., Marissal-Arvy N., Moisan M.P., 2011. Molecular genetics of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220, 127-136.