

Des approches multi-omiques pour caractériser la fin du développement fœtal et mieux comprendre le déterminisme de la maturité à la naissance en lien avec la survie néonatale

Laurence LIAUBET (1), Valentin VOILLET (1), Alain PARIS (2), Isabelle LE HUËROU-LURON (3), Isabelle LOUVEAU (4,5), Florence GONDRET (4,5), Louis LEFAUCHEUR (4,5), Maëva JEGOU (3), Elena TERENINA (1), Sami YAMMINE (1), Yannick LIPPI (6), Cécile CANLET (6), Pascal MARTIN (6), Christine LASCOR (1), Nathalie IANNUCCELLI (1), Yvon BILLON (7), Laurianne CANARIO (1), Magali SAN CRISTOBAL (1)

(1) INRA, GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan

(2) INRA, Unité PNCA, AgroParisTech, F-75231 Paris

(3) INRA, UR1341 ADNC, F-35590 Saint-Gilles

(4,5) INRA, UMR 1348 PEGASE, F-35590 Saint-Gilles ; Agrocampus Ouest, UMR1348 PEGASE, F-35000 Rennes

(6) INRA, UMR 1331 Toxalim, F-31076 Toulouse

(7) INRA, UE1372 GenESI, F-17700 Surgères

laurence.liaubet@toulouse.inra.fr

Avec la collaboration de l'Unité Expérimentale 1372 Génétique, Expérimentation et Système Innovants, F-17700 Surgères

Multi-omic approaches to characterize late fetal development and the determinism of maturity at birth related to neonatal survival

Selection for high prolificacy and lean growth rate in swine has been associated with a substantial increase in piglet mortality. The first 24-48 hours after birth represent a critical period for survival. A major determinant for early survival is piglet maturity at birth which relies greatly on the process of tissue maturation during the last month of gestation. The objective of this study was to compare the progenies from Large White (LW) and Meishan (MS) breeds which differ for piglet survival and neonatal mortality. This project proposes multi-disciplinary and multi-omic approaches to identify the molecular and genetic basis related to maturity and perinatal survival. The metabolome was analyzed on plasma, urine, and amniotic liquid on 612 fetuses: it displayed higher heterogeneity at the end of gestation. The transcriptome of adrenal glands, muscle, liver, subcutaneous adipose tissue, and small intestine and the proteome of muscle and adipose subcutaneous tissue were analyzed on 64 fetuses. The first analyses identified the biological processes involved in development and maturity, and key genes that may explain the differences observed between LW and MS.

Grants: ANR-09-GENM005 PORCINET, INRA (GA et PHASE divisions), and Région Midi-Pyrénées.

INTRODUCTION

La sélection pour la prolificité et le taux de croissance musculaire chez le porc s'est accompagnée d'une augmentation substantielle de la mortalité des porcelets. La maturité est définie comme l'état de plein développement permettant la survie à la naissance. Les processus d'acquisition de cette maturité au cours du dernier mois de gestation et leurs éventuelles variations en relation avec la génétique et l'environnement maternel utérin jouent donc un rôle déterminant dans la mortalité précoce du porcelet. L'objectif du projet ANR PORCINET est d'utiliser deux lignées extrêmes de truies inséminées avec des mélanges de semences pour qualifier l'acquisition de la maturité fœtale chez 4 génotypes de porcelets: les purs Large White (LW) qui se caractérisent par une mortalité néonatale importante, les purs Meishan (MS) qui ont une meilleure vitalité à la naissance, ainsi que les croisés réciproques LWxMS et MSxLW (Terena *et al.*, 2013 ; Canario *et al.*, 2006, 2014). Ce projet propose une approche pluridisciplinaire pour identifier les leviers biochimiques,

moléculaires et génétiques de la survie périnatale. L'objectif est d'identifier les processus biologiques impliqués dans la mise en place de la maturité et des gènes clés pouvant expliquer les différences observées entre LW et MS.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Production des fœtus

La production des 612 fœtus étudiés dans ce projet a été décrite précédemment (Terena *et al.*, 2013 ; Canario *et al.*, 2014). Les fœtus ont été prélevés par césarienne à 90 ou 110 jours de gestation afin de caractériser le dernier tiers du développement intra-utérin.

1.2. Analyse du métabolome, du transcriptome et du protéome

L'urine, le plasma et le liquide amniotique des 612 fœtus ont été prélevés et analysés par RMN ¹H selon une procédure déjà

décrite (Rohart *et al.*, 2012). Un sous-échantillon de 64 fœtus représentatif du dispositif a été choisi pour une analyse de l'expression de 60000 transcrits (puce Agilent développée dans le cadre du projet PORCINET). Les tissus prélevés (muscle longissimus, tissu adipeux sous-cutané, glandes surrénales, foie et intestin grêle) sur ces fœtus ont été analysés (Terenina *et al.*, 2013). Le muscle et le tissu adipeux sous-cutané ont été analysés par protéomique 2D suivie d'une identification des spots différentiels par spectrométrie de masse MS/MS.

1.3. Analyse statistique et fonctionnelle

Une analyse en composante principale (ACP) a été appliquée aux profils métabolomiques. Un modèle linéaire faisant intervenir les deux stades 90 et 110 jours de gestation, les quatre génotypes et l'interaction entre les deux a été appliqué aux données normalisées pour le transcriptome et le protéome. Les seuils de signification des tests ont été ajustés pour tenir compte de la multiplicité des tests. L'analyse fonctionnelle a été effectuée par enrichissement fonctionnel en utilisant des logiciels libres comme DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) ou GeneCodis (<http://genecodis.cnb.csic.es/>).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les profils métabolomiques plasmatiques (Figure 1) se séparent sur le 1^{er} axe selon les deux stades de gestation, 90 et 110 jours. Le 2^{ème} axe de l'ACP sépare les fœtus selon le type génétique de la mère (MS ou LW) à 90 jours mais pas à 110 jours de gestation. A 110 jours de gestation, les échantillons montrent une plus grande dispersion pouvant refléter l'hétérogénéité de portée qui se met en place en fin de gestation.

Tableau 1 – Nombre de transcrits et de protéines différentiels entre les quatre génotypes et les deux stades de gestation et présentation des principales fonctions biologiques pour chaque tissu.

Tissu	Nombre de transcrits différentiels (seuil)	Nombre de protéines différentielles (seuil)	Principaux mécanismes biologiques identifiés
Glandes surrénales	14428 (FDR < 0,1%)	-	Développement, stéroïdogénèse
Muscle longissimus	12326 (Bonferroni < 1%)	435 (FDR < 1%)	Développement, adhésion cellulaire, métabolisme des carbohydrates, glyconéogénèse
Foie	11730 (FDR < 1%)	-	Phosphorylation oxydative, métabolisme des Acides aminés
TASC	17560 (FDR < 1%)	290 ($p < 5\%$)	Métabolisme lipidique, métabolisme des carbohydrates, ré-organisation du cytosquelette
Intestin grêle	9051 (FDR < 1%)	-	Système immunitaire, prolifération/apoptose, métabolismes mitochondrial et protéique

TASC : tissu adipeux sous-cutané ; FDR : 'False Discovery Rate' (taux de faux positifs)

Les analyses du transcriptome et du protéome de plusieurs tissus fœtaux permettent l'identification des mécanismes biologiques impliqués dans la différence de maturité entre LW et MS à la naissance. Les principaux mécanismes biologiques sont présentés dans le tableau 1.

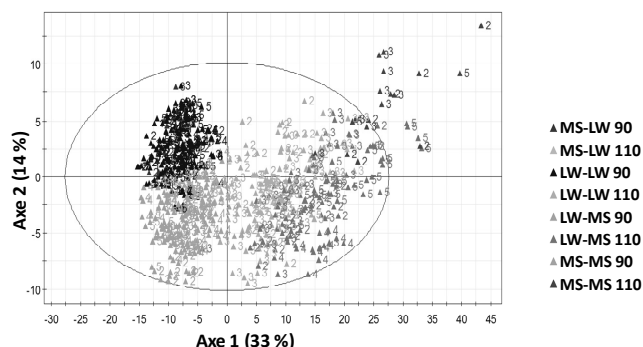


Figure 1 – Analyse en composante principale des profils métaboliques plasmatiques des 612 fœtus.

CONCLUSION

Les approches globales haut débit du métabolome, du transcriptome ou du protéome permettent d'identifier les principaux mécanismes biologiques qui peuvent expliquer les différences de maturité observées à la naissance. Des gènes clés ont été identifiés et sont impliqués dans le développement cellulaire et certains métabolismes comme la gluconéogénèse (muscle) et la stéroïdogénèse (glandes surrénales).

Toutes ces informations devront être intégrées dans un modèle plus complet de la maturation fœtale qui pourra aider à définir des stratégies de sélection génétique et à la mise en évidence de prédicteurs.

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, 3185-3196.
- Canario L., Père M.C., Quesnel H., Billon Y., Mormède P., Riquet J., Liaubet L., 2014. Influences génétiques - Large White et Meishan - sur la fin du développement de fœtus purs et croisés de la même portée. *Journées Rech. Porcine*, 46 (sous presse).
- Rohart F., Paris A., Laurent B., Canlet C., Molina J., Mercat M.J., Tribout T., Muller N., Iannuccelli N., Villa-Vialaneix N., Liaubet L., Milan D., San Cristobal M., 2012. Phenotypic prediction based on metabolomic data for growing pigs from three main European breeds. *J Anim Sci.*, 90, 4729-4740.
- Terenina E., Yammine S., Gress L., Iannuccelli N., Lascor C., Lippi Y., Martin P., Billon Y., Labrune Y., San Cristobal M., Canario L., Liaubet L., Mormède P., 2013. Développement fœtal du porcelet en relation avec la survie à la naissance. Axe corticotrope et transcriptome surrénalien. *Journées Rech. Porcine*, 45, 229-230.