

Effet d'une déplétion-réplétion en phosphore et calcium sur l'expression des gènes et protéines associés au métabolisme phosphocalcique

Enrique GONZALO (1,2), Marie-France PALIN (2), Marie-Pierre LÉTOURNEAU-MONTMINY (1), Agnès NARCY (3), Candido POMAR (2)

(1) Université Laval, 2125 rue de l'Agriculture, Québec, QC, Canada G1V0A6

(2) Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, QC, Canada J1M1Z3

(3) Unité de Recherches Avicoles - INRA, Domaine de l'Orfrasière, 37380 Nouzilly, France

enrique.gonzalo.m@gmail.com

Effects of phosphorus and calcium depletion-repletion on gene and protein expression related with phosphocalcic metabolism

A phosphorus (P) and calcium (Ca) depletion-repletion strategy increases their utilization in growing pigs, but the underlying mechanisms need elucidation. Two groups of 30 pigs (initial BW 24 ± 3.3 kg) were fed with a control (C) or low (L) diet, presenting 100% or 60% P and Ca requirements, respectively. First group was fed during two phases of 28 days with treatments CC, CL or LC, and the 2nd group with CCC, CLC or LCC during three phases. At slaughter, samples of mid-jejunum and kidney were collected to study the expression of genes and proteins related with P, Ca and vitamin D metabolism. A depletion (CL vs CC) increased the mRNA expression of genes in intestine (*TRPV6*, $P = 0.02$) and kidney (*CALB1*, $P = 0.04$; *S100G*, $P = 0.01$) and the expression of renal proteins (*CALB1*, $P < 0.001$; *S100G*, $P = 0.04$) related with Ca absorption. In comparison to LC animals, CL presented a higher mRNA and protein expression of *CALB1* ($P = 0.001$ and $P = 0.001$, respectively) and mRNA expression of *S100G* ($P = 0.003$) in kidney. A repletion (LC vs CC) reduced renal mRNA expression of *SLC20A2* ($P = 0.04$) and *SLC34A3* ($P = 0.04$) and renal protein expression of *SLC20A2* ($P = 0.05$). After three phases, CLC pigs presented a higher ($P = 0.04$) renal *CALB1* protein expression than CCC pigs. Results indicate that a depletion-repletion strategy modifies intestinal and renal gene and protein expression to face dietary mineral modifications.

INTRODUCTION

Une stratégie de déplétion-réplétion en phosphore (P) et calcium (Ca) peut augmenter leur transport afin d'améliorer leur utilisation digestive et métabolique (Létoirneau-Montminy *et al.*, 2014) mais les mécanismes sous-jacents doivent être clarifiés. Afin de mieux les comprendre, l'expression des gènes et l'abondance de protéines associées au transport de P et Ca et à la synthèse de calcitriol (la forme active de la vitamine D) ont été étudiées au niveau de l'intestin et du rein, les deux principaux organes impliqués dans le métabolisme phosphocalcique.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux et régimes alimentaires

Deux groupes de 30 porcs mâles castrés d'un poids vif (PV) initial de $24 \pm 3,3$ kg, ont reçu en alternance un aliment carencé (L) apportant 60% des besoins en P et Ca (Jondreville et Dourmad, 2005) ou non-carencé (C) apportant 100% des besoins. Le groupe 1 a été nourri avec les séquences CC, CL et LC pendant deux phases d'alimentation de 28 jours, et le groupe 2 avec CCC, CLC ou LCC pendant trois phases d'alimentation. Pour chacune des phases, les teneurs de P digestible et Ca total étaient pour l'aliment C, respectivement

3,02, 2,40, 1,89 g/kg et 8,76, 6,95, 5,47 g/kg, et pour l'aliment L, respectivement 1,81, 1,44, 1,13 g/kg et 5,25, 4,17, 3,28 g/kg.

1.2. Collecte d'échantillons et analyses

Les porcs du groupe 1 (PV final $75 \pm 8,0$ kg) et du groupe 2 (PV final $104 \pm 9,9$ kg) ont été abattus à la fin de la 2^e et 3^e phase d'alimentation respectivement. Des échantillons de la membrane de la bordure en brosse du jéjunum et du cortex rénal ont été collectés. L'abondance d'ARNm des gènes liés au métabolisme intestinal et rénal de P (respectivement, *SLC20A1*, *SLC20A2*, *SLC8A1* et *FGFR1111C*, *SLC20A2*, *SLC34A1*, *SLC34A3*), de Ca (respectivement, *S100G*, *TRPV6*, *ATP2B1* et *S100G*, *TRPV5*, *CALB1*) et de la vitamine D (respectivement, *CYP24A1*, *CYP27B1* et *CYP24A1*, *CYP27B1*, *KL*) a été mesurée par qPCR en temps réel. L'expression des protéines au niveau intestinal et rénal pour le P (respectivement, *SLC20A2* et *SLC20A2*, *SLC34A1*), le Ca (respectivement, *S100G*, *TRPV6* et *S100G*, *CALB1*) et la vitamine D (respectivement, *CYP24A1* et *CYP27B1*) a été mesurée par slot blot (Kumar *et al.*, 2014).

1.3. Analyses statistiques

Les traitements ont été comparés entre eux avec la procédure mixed de SAS (version 9.1, Inst. Inc. Cary, NC). Une analyse de variance a été effectuée suivie de comparaisons multiples

entre les traitements avec ajustement de Tukey, en considérant le porc comme unité expérimentale.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les analyses des aliments montraient des apports équivalents à 60% des besoins pour le Ca et 80% des besoins pour le P. Seuls les résultats significatifs sont présentés dans le tableau.

2.1. Déplétion

Au niveau intestinal, les porcs recevant l'aliment CL présentaient un niveau plus élevé d'ARNm pour le transporteur calcique *TRPV6* ($P = 0,02$; Tableau 1) comparativement aux CC. Au niveau rénal, ils montraient également des niveaux plus élevés d'ARNm et de protéines pour les transporteurs calciques *S100G* (respectivement, $P = 0,01$ et $P = 0,04$) et *CALB1* (respectivement, $P = 0,04$ et $P < 0,001$) par rapport aux CC. En comparaison avec les animaux « réplétés » (LC), les CL présentaient au niveau rénal une augmentation de l'expression protéique de *CALB1* ($P = 0,001$) et de l'abondance d'ARNm de *S100G* et *CALB1* (respectivement, $P = 0,003$ et $P = 0,001$), et une tendance pour *CYP27B1* ($P = 0,09$). En conditions de carence calcique, les glandes parathyroïdiennes synthétisent de la parathormone (PTH) qui augmente la résorption osseuse, la réabsorption rénale de Ca et diminue celle de P (Suttle, 2010). Une tendance pour une sous-expression protéique rénale de *SLC34A1*, responsable de la réabsorption rénale du P (Forster *et al.*, 2013), a été observée dans les CC vs CL de notre étude, corroborant une action de la PTH. Cette hormone active également la synthèse de calcitriol, lequel augmente le transport trans-cellulaire intestinal de Ca (Suttle, 2010), ce qui

expliquerait les augmentations dans les animaux CL de l'expression des transporteurs calciques *TRPV6* et *S100G* intestinaux et une tendance pour l'augmentation dans le rein du *CYP27B1*, gène responsable de l'activation du calcitriol.

2.2. Réplétion

Au niveau intestinal, une réplétion en P et Ca dans la deuxième phase (LC vs CC) a induit une tendance à l'augmentation d'ARNm de *CYP24A1* ($P = 0,08$), un gène synthétisé par la PTH et responsable de l'inactivation du calcitriol (Lanteri *et al.*, 2013). Au niveau rénal, les animaux LC présentaient une réduction de l'expression d'ARNm et de protéine de *SLC20A2* (respectivement, $P = 0,04$ et $P = 0,05$) et une tendance de *SLC34A1* (respectivement, $P = 0,09$ et $P = 0,08$), et une réduction d'ARNm de *SLC34A3* ($P = 0,04$) par rapport aux témoins (CC), des gènes et protéines liés au transport du P. Ces réductions liées à la réabsorption rénale du P conjointement à une expression plus élevée du *CYP24A1* sont typiques d'une hyperparathyroïdie. Ces derniers résultats semblent indiquer que les effets de la carence calcique sur le métabolisme phosphoré perdurent même durant la réplétion. Dans la troisième phase, le seul résultat significatif montrait que les CLC présentaient une expression protéique élevée de *CALB1* ($P = 0,04$) par rapport aux CCC au niveau rénal.

CONCLUSION

Les résultats de cette expérience montrent que la stratégie de déplétion-réplétion pratiquée a induit des régulations visant à faire face à la carence calcique qui était plus forte que la carence phosphorique, i.e. 60 vs 80% des besoins respectivement.

Tableau 1 – Résultats de l'expression des gènes et des protéines au niveau rénal et intestinal¹

Intestin	ARNm			Probabilités			Protéine			Probabilités		
	CC	CL	LC	CC vs CL	CC vs LC	CL vs LC	CC	CL	LC	CC vs CL	CC vs LC	CL vs LC
<i>CYP24A1</i>	0,53	1,16	1,74	0,48	0,08	0,53	9,26	9,86	31,8	0,99	0,25	0,24
<i>S100G</i>	0,96	1,30	1,16	0,07	0,40	0,59	5,68	6,77	7,01	0,28	0,40	0,97
<i>TRPV6</i>	0,78	1,11	0,98	0,02	0,18	0,47	5,91	8,41	7,46	0,06	0,36	0,64
Rein	CC	CL	LC	CC vs CL	CC vs LC	CL vs LC	CC	CL	LC	CC vs CL	CC vs LC	CL vs LC
<i>CYP27B1</i>	0,98	1,56	0,88	0,18	0,84	0,09	5,24	7,44	4,13	0,53	0,42	0,24
<i>S100G</i>	0,69	2,84	0,35	0,01	0,21	0,003	6,28	18,4	9,23	0,04	0,81	0,26
<i>CALB1</i>	0,99	1,49	0,95	0,04	0,97	0,001	5,09	10,0	5,96	<0,001	0,55	0,001
<i>SLC20A2</i>	0,88	0,74	0,63	0,52	0,04	0,56	5,67	4,70	3,85	0,68	0,05	0,65
<i>SLC34A1</i>	1,44	1,18	1,09	0,32	0,09	0,81	9,30	5,45	5,61	0,07	0,08	0,98
<i>SLC34A3</i>	1,03	0,84	0,77	0,11	0,04	0,66						

¹ANOVA des moyennes différentes selon le test de Tukey, ($P < 0,05$). C = aliment control (100% besoins Ca total et P digestible), L = aliment carencé (60% des besoins). Valeurs relatives aux gènes de référence, et seuls les résultats significatifs sont présentés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Forster I. C., Hernando N., Biber J., Murer H., 2013. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Asp Med*, 34, 386-395
- Jondreville C., Dourmad J., 2005. Le phosphore dans la nutrition des porcs. *INRA Prod. Anim.*, 18 (3), 183-192.
- Lanteri P., Lombardi G., Colombini A., Banfi G., 2013. Vitamin D in exercise: Physiologic and analytical concerns. *Clin Chi, Acta*, 415, 45-53.
- Létourneau-Montminy M.-P., Lovatto P.A., Pomar C., 2014. Apparent total tract digestibility of dietary calcium and phosphorus and their efficiency in bone mineral retention are affected by body mineral status in growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 92, 3914-3924.
- Kumar S., Zheng H., Deng B., Mahajan B., Grabias B., Kozakai Y., Morin M. J., Locke E., Birkett A., Miura K., Long C., 2014. A slot blot immunoassay for quantitative detection of plasmodium falciparum circumsporozoite protein in mosquito midgut oocyst. *PLoS ONE*, 9 (12), e115807.
- Suttle, 2010. The mineral nutrition of livestock. 4th ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.