

Étude de la maturité des porcelets en fin de gestation par une approche métabolomique multifluides

Gaëlle LEFORT (1, 2), Nathalie VIALANEIX (1), Hélène QUESNEL (3), Marie-Christine PÈRE (3), Yvon BILLON (4), Laurianne CANARIO (2), Nathalie IANNUCELLI (2), Cécile CANLET (5), Alain PARIS (6), Rémi SERVIEN (7), Laurence LIAUBET (2)

(1) MIAT, Université de Toulouse, INRAE, Castanet-Tolosan, France

(2) GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet-Tolosan, France

(3) PEGASE, INRAE, Agrocampus Ouest, Saint-Gilles, France

(4) GenESI, INRAE, Surgères, France

(5) Axiom Platform, MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics, Toulouse, France

(6) MCAM, Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Paris, France

(7) InTheRes, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

gaelle.lefort@inrae.fr

Study of fetal pig maturity using a multi-fluids metabolomic approach

Selection for prolificacy and lean growth in swine has been associated with a substantial increase in piglet mortality. The first 24-48 hours after birth represent the most critical period. A major determinant for early survival is piglet maturity at birth, which relies strongly on maturation during the last month of gestation. The objective of the current study was to compare progeny from Large White and Meishan sows to describe the metabolic status of their fetuses. These two breeds differ in piglet survival. Thirty-nine sows were inseminated with mixed semen and anesthetized at 90 or 110 days after conception (mean gestation: 114 days). Their fetuses (mean = 15.7 per sow) were quickly removed by caesarean section, and this study focused on plasmatic, urinary and amniotic liquid metabolomes (1H-NMR) of 507-604 fetuses. Raw 1D Bruker spectral data files were treated with ASICS, an R package available on Bioconductor. ASICS allowed for direct identification and quantification of ca. 90 metabolites from a library of 190 metabolites, with 63-68 metabolites per fluid, of which 39 were common to the three fluids. Mixed models were applied to the quantification results to explain differences between gestational stages and fetal genotypes. A total of 55 metabolites for plasma, 37 for urine and 46 for amniotic liquid were found to be differential (FDR < 0.05). The results provide new insights into biological pathways involved in piglet maturation. In particular, we found large differences in metabolite concentrations between the two stages of gestation and between the fetal genotypes for certain amino acids and sugars in plasma.

INTRODUCTION

La sélection pour la prolificité et le taux de croissance maigre chez le porc s'est accompagnée d'une augmentation substantielle de la mortalité des porcelets.

Or, la maturité acquise durant le dernier mois de gestation joue un rôle déterminant dans la mortalité précoce du porcelet. L'objectif, ici, est d'identifier les processus métabolomiques impliqués dans la mise en place de cette maturité. Pour ce faire, deux races ayant une survie et une vitalité différentes à la naissance sont comparées : la Large White, caractérisée par une mortalité néonatale importante, et la Meishan, qui a une meilleure vitalité.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

Trente-neuf truies Large White (LW) et Meishan (MS) ont été inséminées avec un mélange de semence de verrats LW et MS de

façon à obtenir des portées mixtes (LWxLW et MSxLW pour les truies LW ; MSxMS et LWxMS pour les truies MS). Les fœtus et des échantillons de leur liquide amniotique, leur plasma et leur urine ont été récupérés par césarienne après anesthésie générale à 90 ou 110 jours de gestation. Au total 288 fœtus LWxLW, 232 MSxLW, 50 MSxMS et 41 LWxMS ont été récupérés.

1.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Pour étudier les métabolomes plasmatique, urinaire et du liquide amniotique, la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) a été utilisée. Les échantillons sont dilués dans de l'eau deutérée. Les spectres ont été acquis avec un spectromètre Bruker Avance DRX-600 (Bruker SA, Wissembourg, France) opérant à 600.13 MHz.

1.3. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.6). Les métabolites ont été quantifiés à travers les spectres grâce à la méthode ASICS (Tardivel *et al.*, 2017 ; Lefort *et al.*, 2019), disponible dans le package R ASICS (version 2.0).

Les données ont été analysées à l'aide de modèles mixtes permettant de prendre en compte l'effet aléatoire de la truie. Des métabolites pour lesquels il y avait une concentration différentielle (FDR < 0,05) entre les groupes (stades de gestation et génotypes des fœtus) ont été obtenus. Enfin des analyses d'enrichissement de voies métaboliques ont été réalisées par fluide sur chacune des listes de métabolites différentiels grâce à l'outil MetaboAnalyst (Chong *et al.*, 2018).

2. RÉSULTATS

2.1. Identification et quantification des métabolites

ASICS a permis d'identifier 63 à 68 métabolites pour chacun des fluides sur les 190 métabolites présents dans la librairie du package. Trente-neuf sont communs aux trois fluides, parmi lesquels plusieurs acides aminés comme l'alanine, la glycine et la proline. D'autres sont spécifiques à un ou deux fluides, comme le glutathion oxydé et le glutathion réduit, identifiés dans l'urine et le liquide amniotique.

2.2. Différences entre les stades de gestation

Les analyses réalisées à partir des modèles mixtes ont permis de mettre en évidence des changements importants de concentration de certains métabolites entre les deux stades de gestation : 51 métabolites pour le plasma, 30 pour l'urine et 44 pour le liquide amniotique. Six voies métaboliques relatives aux acides aminés sont enrichies en métabolites (FDR < 0,05). On retrouve aussi enrichi dans tous les fluides le métabolisme du galactose contenant le myo-inositol (Figure 1).

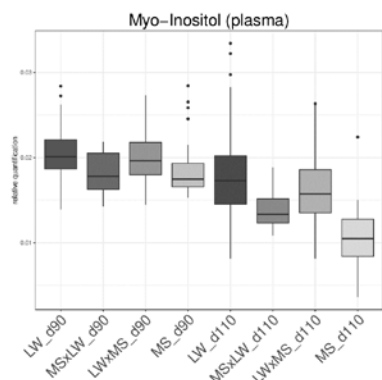


Figure 1 – Quantification relative du myo-inositol dans le plasma par stade de gestation et génotype.

Ce métabolite a déjà été décrit comme un biomarqueur du retard de croissance intra-utérin chez le porc (Nissen *et al.*, 2010). De plus, le myo-inositol fait partie des huit métabolites pour lesquels l'interaction entre le stade de gestation et le génotype est significative.

Le test de l'interaction permet de mettre en évidence les métabolites que l'on suppose les plus en lien avec la mise en place de la maturité (comme étant l'état de plein développement permettant la survie à la naissance).

2.3. Différences entre les génotypes

La différence entre les génotypes est moins marquée, surtout dans l'urine et le liquide amniotique. Néanmoins, dans le plasma, certaines voies métaboliques comme celle du galactose ou de l'arginine et de la proline sont enrichies en métabolites différentiels. En ce qui concerne le métabolisme des acides aminés identifiés par l'analyse d'enrichissement, on observe ce qui pourrait correspondre à un retard de maturation avec l'implication de la proline (Figure 2). La concentration est plus importante pour les Meishan aux deux stades de gestation et la concentration pour les Large White à 110 jours est assez proche de la concentration pour les Meishan à 90 jours de gestation. Il a récemment été montré qu'une concentration plus importante de proline était associée à une meilleure survie néonatale (Liu *et al.*, 2019).

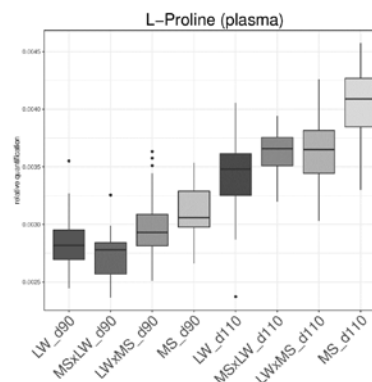


Figure 2 – Quantification relative de la proline dans le plasma par stade de gestation et génotype.

CONCLUSION

L'identification et la quantification des métabolites ont permis une analyse des différences entre les stades de gestation et les génotypes des fœtus sur les trois fluides. Les différences sont apparues plus importantes entre les deux stades de gestation qu'entre les génotypes. Le retard de maturité observé chez les Large White pourrait être associé à la concentration de certains métabolites surtout dans le plasma. Une analyse plus précise des voies métaboliques enrichies en métabolites différentiels est actuellement en cours ainsi qu'une intégration avec les résultats d'expression des gènes obtenus sur le muscle et le foie (en particulier les gènes codant les enzymes permettant les réactions métaboliques).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lefort G., Liaubet L., Canlet C., Tardivel P., Pere M. C., Quesnel H., Paris A., Iannuccelli N., Vialaneix N., Servien R., 2019. ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra. *Bioinformatics*, btz248, *Forthcoming*
- Tardivel P. J., Canlet C., Lefort G., Tremblay-Franco M., Debrauwer L., Concordet D., Servien R., 2017. Asics: An automatic method for identification and quantification of metabolites in complex 1D 1 H NMR spectra. *Metabolomics*, 13, 109.
- Chong J., Soufan O., Li C., Caraus I., Li S., Bourque G., Wishart DS., Xia J., 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*, 46, W486-W494.
- Liu N., Dai Z., Zhang Y., Chen J., Yang Y., Wu G., Tso P., Wu Z., 2019. Maternal L-proline supplementation enhances fetal survival, placental development, and nutrient transport in mice. *Biol. Reprod.*, 100, 1073-1081.
- Nissen P.M., Nebel C., Oksbjerg N., Bertram H.C., 2010. Metabolomics reveals relationship between plasma inositols and birth weight: possible markers for fetal programming of type 2 diabetes. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 378268.