

# Le sevrage affecte de manière différente la fonction mitochondriale, le stress oxydatif et l'apoptose chez des porcelets de poids normaux et de faibles poids

Jérôme LAPOINTE, Aliny K. NOVAIS, Karine DESCHÊNE, Caroline ROY, Yan MARTEL-KENNES,  
Martin LESSARD, Jacques MATTE

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherche et de développement de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

[Jerome.lapointe@canada.ca](mailto:Jerome.lapointe@canada.ca)

## Weaning differentially affects mitochondrial function, oxidative stress and apoptosis in normal and low birth weight piglets

Weaning is associated with dysfunctional immune responses, inflammation and oxidative stress in piglets, especially those with low birth weight. Mounting evidence indicates that mitochondria are related to immunity, inflammation and antioxidant defenses. The objective of this study was to characterize links between mitochondria and these processes in both normal and low birth weight (NBW and LBW) piglets throughout the peri-weaning period. To conduct the study, 30 sows were inseminated, and specific piglets from their litters were assigned to one of two experimental groups: NBW ( $n = 60$ ,  $1.73 \pm 0.01$  kg,) and LBW piglets weighing less than 1.2 kg ( $n = 60$ ,  $1.01 \pm 0.01$  kg). Then, 10 piglets from each group were selected at 14, 21 (weaning), 23, 25, 29 and 35 days of age to collect organs (liver and intestinal mucosa). Specific porcine RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Arrays related to mitochondrial function, oxidative stress, inflammation and apoptosis processes were first used to target genes that are modulated following weaning (d 23 and d 35 vs. d 14). Expression of selected genes was evaluated by quantitative PCR. These analyses revealed that mRNA expression of inflammatory molecules (CXCL10 and CCL19) increased after weaning in intestinal mucosa, while expression of genes encoding subunits of the mitochondrial respiratory chain (NDUFA2 and NDUFA5) was downregulated in the liver of both groups ( $P < 0.05$ ). Interestingly, major modulators of mitochondrial apoptosis (BCL2 and BNIP3) and antioxidant defense system (TXNRD2, GPx3, HMOX1) were found to be highly expressed in NBW than LBW piglets ( $P < 0.05$ ). These results indicate that weaned piglets experience mitochondrial dysfunction and inflammation and suggest that LBW piglets have compromised mitochondrial apoptosis and antioxidant defense processes.

## INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, des variations plus prononcées au niveau des poids des porcelets à la naissance et une augmentation de l'occurrence de porcelets présentant de faibles poids ont été observées en production porcine. Ces porcelets sont reconnus comme ayant des déficiences immunitaires et métaboliques qui les rendent plus fragiles en période de stress. Le sevrage est reconnu pour imposer un stress nutritionnel aux porcelets et pour affecter leurs fonctions métaboliques, physiologiques et immunologiques. Les mitochondries sont des organelles dynamiques qui sont principalement reconnues pour être la principale source d'énergie des cellules, mais qui sont également étroitement liées au stress oxydatif, à l'immunité, à l'inflammation et à la mortalité cellulaire programmée (apoptose). Nous avons récemment démontré que le sevrage affecte la fonction mitochondriale et la réponse au stress des porcelets (Novais *et al.*, 2019). Nous avons également suggéré que la modulation de la fonction mitochondriale par des stratégies nutritionnelles ciblées pourrait améliorer la santé et la résistance des porcs (Lapointe *et al.*, 2014). Cependant, le manque de connaissances reliées aux impacts du sevrage sur les mécanismes moléculaires régissant les statuts métabolique, oxydatif et inflammatoire des

porcelets limite le développement de telles stratégies. La présente étude vise donc à caractériser ces mécanismes chez des porcelets de poids normaux et de faibles poids en période péri-sevrage.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Les animaux et la collecte d'échantillons

Ce projet a été approuvé par le comité local de protection des animaux. Dans ce projet, 30 truies Yorkshire x Landrace multipares ont été inséminées afin d'obtenir des portées qui ont été uniformisées à 12 porcelets dans un délai de 48 heures.

Parmi les porcelets générés, ceux présentant les caractéristiques requises ont été assignés à l'un des deux groupes suivants : porcelets de poids normaux (NBW,  $n = 60$ ) et porcelets de faible poids (LBW,  $n = 60$ ). Les porcelets NBW ont été définis comme ayant un poids à la naissance se situant entre la moyenne des poids et une valeur d'écart-type ( $1,73 \pm 0,01$  kg) tandis que les porcelets LBW ont été sélectionnés parmi ceux ayant un poids inférieur à 1,2 kg ( $1,01 \pm 0,01$  kg). Ensuite, 10 porcelets de chaque groupe ont été euthanasiés à J-14, avant le sevrage (J-21), ainsi qu'à J-23, J-25, J-29 et J-35 pour la collecte d'échantillons (foie et intestin).

## 1.2. Analyses de l'expression des gènes et statistiques

L'ARN total a été isolé des échantillons en utilisant des colonnes d'affinité RNeasy (Qiagen) et l'ADNc a été synthétisé avec l'enzyme Superscript IV (ThermoFisher). Les analyses de profils d'expression de gènes porcins spécifiques à la fonction mitochondriale, au stress oxydatif, à l'inflammation et à l'apoptose (J-23 and J-35 versus J-14) ont été réalisées pour les porcelets NBW en utilisant des RT<sup>2</sup> Profiler<sup>™</sup> PCR Arrays en suivant les recommandations du fournisseur (Qiagen). Les niveaux d'expression ont été comparés avec le logiciel RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Data Analysis Software 3.5 (Qiagen) basé sur des t- tests de Student. L'expression relative de l'ARNm des gènes d'intérêt identifiés avec ces analyses a par la suite été quantifiée dans les échantillons de foie et d'intestin des porcelets NBW et LBW abattus aux différents jours par PCR quantitative (qPCR) en utilisant le 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). L'expression relative des gènes ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) a été normalisée en utilisant des gènes de référence spécifiques à chaque organe. Ces résultats ont été analysés avec le logiciel SAS (SAS 9.2). Des analyses de la variance ont été effectuées afin de caractériser les effets des deux facteurs de l'étude (poids à la naissance et âges des porcelets). Les effets étaient considérés significatifs à  $P \leq 0,05$ , et les tendances à  $P \leq 0,10$ .

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les analyses des profils d'expression (J-23 and J-35 vs J-14) de gènes porcins spécifiques à la fonction mitochondriale, le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose a permis d'identifier que, suite au sevrage, l'expression de gènes codant pour des sous-unités de la chaîne de respiration mitochondriale (*Ndufa2* et *Ndufa5*) était réprimée dans le foie tandis que celle d'autres gènes codant pour des promoteurs de l'inflammation était induite dans l'intestin. Une répression de l'expression de gènes reliés aux processus de stress oxydatif et de l'apoptose a également été identifiée avec ces analyses (Tableau 1).

**Tableau 1** – Niveaux d'expression relative des gènes des différents groupes fonctionnels en post-sevrage (J-23 et 35) en rapport avec la période pré-sevrage (J-14)

Groupe	Organe	Gène	J23/J14 <sup>1</sup>	J35/J14 <sup>1</sup>
Métabolisme	Foie	<i>Ndufa2</i>	-6,7*	1,8
		<i>Ndufa5</i>	-1,6*	-1,1
Inflammation	Intestin	<i>Cxcl10</i>	6,4	6,4*
		<i>Ccl19</i>	7,9*	2,4*
Apoptose	Foie	<i>Bnip3</i>	-1,5	-1,9 <sup>†</sup>
	Intestin	<i>Bcl2</i>	2,3	-1,3*
Stress	Foie	<i>GPx3</i>	-3,1 <sup>†</sup>	-4,6*
		<i>Hmox1</i>	-2,6	-3,4 <sup>†</sup>
		Intestin	<i>Txnrd2</i>	2,3*

<sup>1</sup>Le Niveau de modulation de l'expression ( $2^{\Delta(-\Delta\Delta CT)}$ ) correspond à l'expression normalisée du gène ( $2^{\Delta(-\Delta CT)}$ ) au jour 23 ou 35 divisé par l'expression normalisée du même gène ( $2^{\Delta(-\Delta CT)}$ ) au jour 14. \*Effet significatif de l'âge ( $P < 0,05$ ) <sup>†</sup>Tendance du jour ( $P < 0,10$ )

L'analyse de l'expression relative de ces gènes d'intérêt aux différents âges par qPCR a confirmé que l'expression des gènes *Ndufa2* et *Ndufa5* était réprimée immédiatement après le sevrage en accord avec la baisse de production d'énergie reconnue pour subvenir dans cette période.

La présence d'inflammation intestinale a également été confirmée, avec une augmentation de l'expression des gènes codant pour les cytokines *CXCL10* et *CCL19* (Tableau 2).

**Tableau 2** – Expression relative des gènes ciblés durant la période péri-sevrage

	Âges des porcelets (Jours)						
	14	21	23	25	29	35	ESM <sup>2</sup>
<b>Foie</b>							
<i>Ndufa2</i> <sup>1</sup>	499,4	486,8	358,2	323,8	384,4	527,5	35,6
<i>Ndufa5</i> <sup>1</sup>	69,4	69,0	59,7	52,3	63,9	69,4	6,7
<b>Intestin</b>							
<i>Cxcl10</i> <sup>1</sup>	5,9	8,5	26,2	7,3	21,5	44,4	8,9
<i>Ccl19</i> <sup>1</sup>	2,5	5,4	15,9	7,5	4,7	10,4	1,9

Les données présentées sont les moyennes ajustées pour les âges ( $n=20$ ), aucun effet du poids ( $P > 0,26$ ). Aucune interaction poids x âges ( $P > 0,16$ ). <sup>1</sup>Effet significatif de l'âge ( $P < 0,05$ ) <sup>2</sup>Erreur standard de la moyenne

La plus faible expression des gènes induisant l'apoptose (*Bnip3* et *Bcl2*) chez les porcelets LBW suggère que l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles est perturbée chez ces derniers.

L'efficacité de la réponse au stress oxydatif semble également affectée chez ces porcelets, tel que suggéré par une baisse de l'expression des gènes *GPx3*, *Hmox1* et *Txnrd2*.

**Tableau 3** – Expression relative des gènes ciblés en fonction du poids de naissance

Organe	Gène	LBW	NBW	ESM <sup>3</sup>
Foie	<i>Bnip3</i> <sup>1</sup>	17,1	57,8	11,7
	<i>Gpx3</i> <sup>1,2</sup>	24,2	38,1	9,5
	<i>Hmox1</i> <sup>1,2</sup>	28,1	36,1	6,1
	<i>Txnrd2</i> <sup>1,2</sup>	9,5	12,9	2,5
Intestin	<i>Bcl2</i> <sup>1,2</sup>	5,7	7,1	1,7

Les données présentées sont les moyennes ajustées pour les poids ( $n=60$ ), Aucune interaction poids x âge ( $P > 0,41$ ). <sup>1</sup>Effet significatif du poids ( $P < 0,05$ ) <sup>2</sup> Effet significatif de l'âge ( $P < 0,05$ ) <sup>3</sup>Erreur standard de la moyenne

## CONCLUSION

Les résultats de cette étude suggèrent que la fonction mitochondriale et la réponse inflammatoire sont perturbées par le sevrage et que les mécanismes cellulaires reliés à la défense face au stress oxydatif et à l'apoptose sont compromis chez les porcelets de faible poids.

Ces informations seront utiles à l'élaboration de stratégies nutritionnelles ciblées visant à augmenter la robustesse des porcelets.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lapointe J., 2014. Mitochondria as promising targets for nutritional interventions aiming to improve performance and longevity of sows. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berlin), 98, 809-821.
- Novais A.K., 2019. Tissue-specific profiling reveals modulation of cellular and mitochondrial oxidative stress in normal and low birth weight piglets throughout the peri-weaning period. Animal (in press).