

# Des apports contrastés en calcium sont associés à un métabolome plasmatique distinct chez les porcelets

Angel René ALFONSO-AVILA (1,2), Benedict YANIBADA (2), Marie-Pierre LETOURNEAU-MONTMINY (2)

(1) Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD), 120-A chemin du Roy, Deschambault, GOA 1S0, Canada

(2) Université Laval, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Département des Sciences Animales 2425 rue de l'Agriculture, Québec, G1V 0A6, Canada

angel-rene.alfonso-avila@crsad.qc.ca

## Contrasting calcium intakes are associated with distinct plasma metabolome in piglets

Reviewed calcium (Ca) recommendations suggest that Ca excess impair performance and bone mineral content (BMC) in piglets. This experiment was conducted to evaluate impacts of Ca reduction (Low Ca) after weaning compared to NRC (2012) recommendations and a reduced phosphorus (P) strategy (Low P). The results presented consist of the second feeding phase (8 to 12 days after weaning) of the experiment. The treatments were 1) Low Ca (Phase 2, 0.51% Ca and 0.47% ileal standardised digestible P (STTD P), 2) NRC (Phase 2, 0.85% Ca and 0.42% STTD P) and 3) Low P (Phase 2, 0.65% Ca and 0.38% STTD P). Piglets (n = 953) were distributed into pens (by sex and initial body weight;  $6.0 \pm 0.028$  kg). At the end of phase 2, blood was collected, and dual X-ray bone densitometry was performed using 8 piglets per treatment. Untargeted LC-MS metabolomic analysis was performed on plasma of the piglets (n = 8 per treatment). Data were analysed using the SAS MIXED procedure. At day 12 after weaning, BW was similar, whereas magnesium (Mg), globulin and BMC were increased ( $P \leq 0.01$ ) with the Low Ca diet. Ratios of Ca:P and Ca:VitaminD<sub>3</sub> were decreased ( $P = 0.01$ ) by Low Ca. Metabolome analysis showed that Low Ca dietary conditions induce immune and metabolic stress (increased plasma globulin, vitamin D<sub>3</sub>, Mg, tyrosine, dopamine, and p-cresol), but also enhance metabolite concentrations (organic osmolytes) that allow to cope challenged conditions.

## INTRODUCTION

Une alimentation précise en phosphore (P) des porcs est un des piliers du développement durable dans les régions à forte densité d'élevage. Ceci exige l'estimation précise des teneurs de P des aliments, la prise en compte des facteurs de modulation dont l'apport de calcium (Ca) et une détermination précise des besoins. Les travaux récents pour préciser les apports de calcium indiquent qu'un excès de Ca est préjudiciable aux performances de croissance et à la minéralisation osseuse (Lagos *et al.*, 2019). En parallèle, l'effet tampon élevé du carbonate de Ca amène certains à suggérer que le niveau de Ca des régimes de démarrage devrait être limité pendant une courte période (Huting *et al.*, 2021). L'objectif de l'étude était d'évaluer l'impact de différents apports de Ca et P sur les performances, la minéralisation osseuse et différents paramètres sanguins du métabolisme général et phosphocalcique chez le porcelet en post-sevrage.

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Expérimentation animale

Neuf-cent-cinquante-trois porcelets (276/275 Génétique Fast x PIC 800) sevrés à 21 jours avec un poids moyen de  $6,0 \pm 0,028$  kg et distribués en 13 blocs ont reçu un des trois traitements

alimentaires en quatre phases d'alimentation. La durée totale de l'expérience fut de 41 jours, et les données présentées concernant la phase 2 (8 à 12 jours après le sevrage). Les teneurs spécifiques en Ca et P digestible (Pdig) des phases 1 et 2, respectivement, pour le lot Bas Ca (Ca : 0,51, 0,60 % ; Pdig : 0,5, 0,45 %), pour le traitement NRC (NRC 2012) (Ca : 0,85, 0,80 % ; Pdig : 0,45, 0,41 %) et le lot Bas P (Ca : 0,65, 0,65 % ; Pdig : 0,38, 0,39 %), ce dernier ressemblant davantage aux stratégies européennes. Tous les traitements ont reçu 2000 FTU de phytase pendant les deux premières phases d'alimentation. Des échantillons de sang ont été prélevés au jour 12 et des radiographies par ostéodensitométries à double rayons X (DXA, Hologic Discovery W) ont été réalisées sur les mêmes porcelets. Les données ont été analysées par la procédure MIXED de SAS avec le test de Tukey pour comparer les traitements (l'animal est l'unité expérimental).

#### 1.2. Plasma

Les concentrations plasmatiques en Ca, P, Mg, et globuline ont été déterminés par un analyseur chimique portable (VetScan VS2, Abaxis). Les concentrations en vitamine D<sub>3</sub> ont été mesurées à l'aide d'un kit ELISA spécifique.

#### 1.3. Métabolome

Une analyse métabolomique par approche ouverte a été

réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) sur les échantillons de plasma de 8 porcelets sur des groupes contrastés en apport en Ca (Bas Ca vs. NRC) au jour 12 après le sevrage. Les échantillons ont été préparés suivant la méthode décrite par Yanibada *et al.* (2020) et les données du métabolome ont été analysées sous Galaxy W4M. Des analyses statistiques multivariées OPLS-DA ont été réalisées. La détermination des variables discriminant les groupes est fondée sur le score des variables importantes pour la prédiction (VIP ; seuil : VIP > 1).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les performances de croissance n'ont pas été modifiées par les

**Tableau 1** – Effet des traitements alimentaires sur les concentrations plasmatiques de calcium (Ca), phosphore (P), magnésium (Mg), vitamine D<sub>3</sub>, globuline, performances et sur la minéralisation osseuse (CMO) 12 jours après sevrage

	Bas Ca	NRC	Bas P	e.t.m. <sup>1</sup>	P-value
Ca, mmol/L	1,35	1,39	1,34	0,028	0,49
P, mmol/L	3,18	2,92	2,96	0,179	0,54
Mg, mmol/L	0,94 <sup>a</sup>	0,85 <sup>ab</sup>	0,76 <sup>b</sup>	0,030	0,003
Vitamine D <sub>3</sub> , ng/mL	6,87	4,05	6,33	1,3	0,29
Ca : P	0,830 <sup>b</sup>	0,985 <sup>a</sup>	0,955 <sup>ab</sup>	0,148	0,02
Ca : Vitamine D <sub>3</sub>	0,150 <sup>b</sup>	0,218 <sup>a</sup>	0,199 <sup>a</sup>	0,037	0,02
Globuline, g/L	16,8 <sup>a</sup>	10,6 <sup>b</sup>	10,1 <sup>b</sup>	0,575	0,01
Poids corporel, kg	8,21	8,35	8,03	1,178	0,83
CMO, g/g de poids vif	0,020 <sup>a</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,018 <sup>b</sup>	0,0002	0,001

<sup>1</sup> e.t.m. erreur type de la moyenne ; lettres différentes par ligne indiquent P < 0,05. Comparaison de moyenne par test de Tukey.

**Tableau 2** – Métabolites plasmatiques discriminant les deux groupes expérimentaux

Nom	VIP <sup>1</sup>	Facteur de changement (NRC/Bas Ca)	Variation
Choline	1,8	1,29	↗
Acide citrique	2,2	0,74	↘
P-crésol	1,4	1,25	↗
Dopamine	1,3	1,01	↗
Homostachydrine	1,5	1,34	↗
L-Carnitine	1,5	1,35	↗
Pipericine	1,9	2,06	↗
Tyrosine	1,6	1,07	↗
Uridine	2,3	0,92	↘
Valine bêtaïne	1,4	1,27	↗

<sup>1</sup>VIP : Variable importante en prédiction. <sup>2</sup>P-value variables discriminantes.

La ration Bas Ca a réduit la teneur plasmatique en citrate et en uridine (Tableau 2). Le citrate régulerait la distribution du flux de carbone dans la biosynthèse de l'uridine, ce qui affecte le métabolisme énergétique (Chen *et al.*, 2010). La tyrosine, la

traitements alimentaires tout comme les teneurs plasmatiques en Ca et P (Tableau 1). Une augmentation du Mg plasmatique a été observée avec le traitement Bas Ca (P = 0,003). Comme dans le cas d'un hyperparathyroïdie secondaire causée par une hypocalcémie (Fang *et al.* 2016), il est probable que le Mg soit libéré par la résorption osseuse ostéoclastique. Les ratios Ca :P et Ca :Vit D<sub>3</sub> étaient plus faibles chez les porcs du lot Bas Ca (P = 0,02) indiquant des régulations (e.g. de type intestinale, rénale et/ou osseuse) de maintien de la calcémie. Le contenu minéral osseux était plus faible chez les Bas P que chez le Bas Ca et le NRC (P = 0,001) suggérant qu'il manquait possiblement de P. L'aliment Bas Ca a augmenté la teneur en globuline du plasma, une réponse liée à l'activité antigénique accrue et à un stress métabolique plus important.

dopamine et le p-crésol ont été augmentés chez les Bas Ca, présentant une relation entre les voies métaboliques identifiées et associées au stress. L'augmentation du p-crésol suggère une modulation bactérienne, ce qui résulte en une exposition génotoxique majeure (Al Hinai *et al.*, 2019). La ration Bas Ca a induit une réponse de compensation par l'augmentation de la choline, la L-carnitine, l'homostachydrine et la valine bêtaïne. Ces solutés sont des osmolytes organiques qui servent de cryoprotecteurs compatibles, métaboliques et antagonistes en cas stress (Yancey, 2005). La pipericine, une amine avec des potentiels rôles fonctionnels antioxydants est augmentée dans les conditions Bas Ca (Meghwal *et al.*, 2021).

## CONCLUSION

Les résultats de cette étude ont montré que les apports en Ca n'ont pas affecté les performances des porcelets. La caractérisation des métabolites comme approche alternative d'évaluation lors de l'optimisation des apports en Ca a permis d'identifier des biomarqueurs potentiels impliquant l'immunité et le stress métabolique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al Hinai E.A., Kullamethee P., Rowland I.R., Swann J., Walton G.E., Commane D.M., 2019. Modelling the role of microbial p-cresol in colorectal genotoxicity. *Gut Microbes*, 10, 398-411.
- Chen Y., Li S., Xiong J., Li Z., Bai J., Zhang L., Ye Q., Ouyang P., Ying H., 2010. The mechanisms of citrate on regulating the distribution of carbon flux in the biosynthesis of uridine 5'-monophosphate by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(1), 75-81.
- Fang L., Tang B., Hou D., Meng M., Xiong M., Yang J., 2016. Effect of parathyroid hormone on serum magnesium levels: the neglected relationship in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ren. Fail.* 38(1), 50-56.
- Huting A., Middelkoop A., Guan X., Molist F., 2021. Using nutritional strategies to shape the gastro-intestinal tracts of suckling and weaned piglets. *Animals*, 11(2), 402.
- Lagos L.V., Walk C.L., Murphy, M.R., Stein H.H., 2019. Effects of dietary digestible calcium on growth performance and bone ash concentration in 50-to 85-kg growing pigs fed diets with different concentrations of digestible phosphorus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 247, 262-272.
- Meghwal M., Devu S., Singh H., Goswami T.K., 2021. Piperine and curcumin. In : *A Centum of Valuable Plant Bioactives* (pp. 589-612). Academic Press, London, United Kingdom.
- Yancey P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208(15), 2819-2830.
- Yanibada B., Hohenester U., Pétéra M., Canlet C., Durand S., Jourdan F., Boudra H., 2020. Inhibition of enteric methanogenesis in dairy cows induces changes in plasma metabolome highlighting metabolic shifts and potential markers of emission. *Sci. Rep.*, 10(1), 1-14.