

Évaluation du statut minéral de la truie gestante à partir de prélèvements salivaires analysés avec deux méthodes

Clément RIBAS (1,2), Nathalie QUINIOU (2), Cécile PERRIER (1), Charlotte GAILLARD (1)

(1) PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590 Saint-Gilles, France

(2) IFIP-Institut du Porc, 9 Boulevard du Trieux, 35740 Pacé, France

charlotte.gaillard@inrae.fr

Assessment of the mineral status of gestating sows using saliva samples and two methods

Phosphorus (Phos) is a limited and non-renewable resource in pig diets. Supplying too much Phos results in surface water pollution, while supplying too much calcium (Ca) decreases Phos absorption. Deficiencies in Ca or Phos impact sows differently, for example regarding bone resorption. The degree to which intake meets requirements can be assessed by the urinary Ca:Phos ratio in gestating sows. Collecting urine can be time consuming and limits the number of individuals sampled. Because collecting saliva is easier and faster, more animals can be sampled during a sampling session or the session can be shortened. The aim of this study was to compare two methods of Phos and Ca analysis (inductively coupled plasma spectrometry (ICP) or colorimetric analysis using a discrete analyser (Gallery)) to characterise urine and saliva samples (two matrices) collected from 20 gestating sows at the end of gestation. The matrix and analytical method used significantly influenced Phos concentration ($P = 0.048$) but not Ca concentration ($P > 0.10$). Urinary Phos was nearly 10 times as high as salivary Phos. Analysed Phos was higher with ICP than Gallery. Salivary and urinary Phos according to each method were not correlated ($|r| < 0.10$, $P > 0.10$), while salivary and urinary Ca were weakly correlated according to the Gallery and ICP ($r = -0.21$ ($P = 0.40$) and $r = 0.44$ ($P = 0.05$), respectively). Thus, the analytical method used to determine Phos concentrations must be considered when data from different studies are compared. Unlike the urinary Ca:Phos ratio, the salivary Ca:Phos ratio is not a reliable indicator of the mineral status of sows.

INTRODUCTION

Le phosphore (Phos) incorporé dans les aliments des porcs est issu de ressources limitées et non renouvelables. Il est donc important de maximiser son efficacité d'utilisation par les animaux. L'adéquation entre les apports et les besoins peut-être évaluée grâce au rapport phosphocalcique urinaire (Grez-Capdeville et Crenshaw, 2021). Cependant, la collecte d'urine peut être chronophage et peut limiter le nombre d'individus prélevés. Ainsi, la salive est un fluide physiologique de plus en plus utilisé pour assurer le suivi des animaux, notamment des truies (Contreras-Aguilar *et al.*, 2021). La collecte est simple à réaliser par des personnes non entraînées et ne nécessite pas beaucoup de matériel (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019). Cependant, les teneurs en biomarqueurs de la salive sont généralement plus faibles que celles observées dans les autres fluides tel que le sérum et l'urine, et la corrélation entre les valeurs obtenues dans les différents fluides dépend des biomarqueurs étudiés (Kersch-Schindl *et al.*, 2020).

L'objectif de cette étude est de comparer les teneurs en Phos et calcium (Ca) dans l'urine et la salive des truies gestantes après analyse avec deux méthodes de dosage.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

L'essai a été réalisé sur 20 truies croisées Large White x Landrace issues de la station CIRI de l'IFIP (35850 Romillé,

France), sur lesquelles des échantillons d'urine et de salive ont été collectés durant le dernier mois de gestation. La veille du prélèvement, les truies étaient déplacées de leur case d'élevage en groupe vers une case individuelle, où elles recevaient le repas de l'après-midi. Le lendemain, après une nuit sans accès à l'aliment, un pot d'urine était collecté à partir de la première miction spontanée de la journée (entre 8h et 11h), dont 15 mL étaient immédiatement mis en tube fermé au frais dans une glacière. Ensuite, chaque truie était incitée à machouiller pendant au minimum une minute trois tampons absorbants synthétiques (Salivette® Cortisol, Sarstedt, Allemagne) maintenus à l'extrémité d'une pince à pansement. Une fois imbibés, les tampons salivaires étaient remis chacun dans leur contenant et mis au frais. Une fois les collectes terminées, les tubes d'urine et ceux contenant les tampons imprégnés de salive étaient centrifugés, respectivement, à 2500 tours pendant 10 min à 4°C et à 3000 tours pendant 10 min à 4°C, aliquotés et conservés à -20°C avant analyses chimiques.

1.2. Analyses de laboratoire

Les teneurs en Phos et Ca des deux matrices (urine et salive) ont été déterminées au laboratoire de l'UMR PEGASE (INRAE, 35590 Saint-Gilles, France) à l'aide de deux méthodes d'analyse. La première utilise un dosage colorimétrique sur analyseur séquentiel (Gallery plus, ThermoFischer Scientific, USA) pour doser le Phos inorganique. La seconde repose sur l'analyse des spectres lumineux des échantillons ionisés par spectrométrie à plasma par couplage inductif (5110 ICP-OES, Agilent, USA) pour

doser le Phos total. Le volume minimal prélevé de chaque échantillon était de 100 µL avec un volume minimal de 5 mL pour l'ICP. Toutes les analyses ont été effectuées en duplicat.

1.3. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R v4.2.2 (R Core Team, 2022). Un modèle linéaire mixte avec la fonction lme du package nlme a été utilisé pour tester les effets (fixes) de la matrice (urine vs. salive), de la méthode d'analyse (Gallery vs. ICP), et de l'interaction entre ces deux facteurs, sur les concentrations en Phos et en Ca. La truie a été intégrée dans le modèle comme effet aléatoire. Pour chaque méthode d'analyse et chaque minéral, la corrélation de Spearman a été utilisée pour étudier la relation entre les concentrations des deux matrices. Les différences ont été considérées significatives lorsque la *P*-value était inférieure à 0,05.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Quarante échantillons ont été analysés (20 urines et 20 salives). Trois échantillons d'urine présentaient une teneur en Phos en dehors de la gamme mesurable au Gallery et un autre avec une teneur en Ca hors gamme à l'ICP. Les résultats de Phos dosé à l'ICP de deux échantillons d'urine et de salive n'ont pas été utilisés en raison de différences importantes entre duplicats, persistant après répétition des dosages (coefficients de variation (CV) supérieur à 10%). Vingt échantillons présentaient un CV compris entre 5 et 10% principalement pour les analyses de Phos à l'ICP. Homogénéiser les échantillons avec un vortex avant chaque pipetage apparaît efficace pour réduire le CV des échantillons re-dosés, indiquant une probable sédimentation du Phos dans les cupules. Celle-ci peut être due à une liaison du Phos à d'autres molécules présentes dans la matrice, conduisant à du Phos particulaire (Dorioz *et al.*, 1997).

Le résultat du dosage de Phos dépend de la matrice et de la méthode d'analyse (Tableau 1, *P* = 0,048).

En effet, pour les mêmes individus, la concentration en Phos est plus faible dans la salive que dans l'urine, avec pour la salive un facteur de 10 environ par rapport à l'urine quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. Les valeurs obtenues dans la salive sont proches des limites basses de détection des appareils. Pour les mêmes échantillons, les concentrations obtenues avec l'ICP sont plus élevées que celles obtenues avec le Gallery. Or, ce dernier dose le Phos inorganique tandis que l'ICP mesure le Phos total. Les concentrations plus élevées obtenues avec l'ICP par rapport au Gallery indiquent donc la présence de Phos non-organique ou de Phos particulaire non détectable au Gallery dans les matrices étudiées. Les résultats de dosage du Ca ne sont influencés ni par la matrice (*P* = 0,30) ni par la méthode d'analyse (*P* = 0,15). Les concentrations obtenues dans la salive à l'ICP sont du même ordre de grandeur que celles obtenus par Contreras-Aguilar *et al.* (2021) pour le Phos et le Ca. Ils suivent la même tendance que d'autres biomarqueurs dans la salive avec une concentration dix fois plus faible dans la salive par rapport au sérum (Kersch-Schindl *et al.*, 2020). Avec aucune des deux méthodes, le Phos salivaire n'est corrélé au Phos urinaire ($|r| < 0,10$, *P* > 0,10). Pour le Ca, la corrélation entre l'urine et la salive est faible et soit négative avec l'ICP (*r* = -0,21, *P* = 0,40), soit positive avec le Gallery (*r* = 0,44, *P* = 0,05).

CONCLUSION

Nos résultats montrent qu'il est important de prendre en considération la méthode de dosage du Phos lorsqu'il s'agit de comparer les résultats de différentes études. Dans notre étude, la concentration en Phos dans la salive est 10 fois plus faible que dans les urines et aucune corrélation significative n'est observée entre les deux matrices. Il en est de même entre les teneurs en Ca. Le dosage de minéraux dans des prélèvements salivaires n'apparaît donc par pertinent pour évaluer l'adéquation entre les apports de Phos et de Ca et les besoins de la truie gestante.

Tableau 1 – Moyenne (± écart-type) des teneurs en phosphore et calcium selon la matrice et la méthode d'analyse utilisées

	Urine		Salive		<i>P</i> -value ¹			Corrélation ²	
	Gallery	ICP	Gallery	ICP	Matrice	Méthode	Interaction	Gallery	ICP
Phosphore, mg/L	41,3 (± 48,5)	82,0 (± 82,0)	5,4 (± 2,1)	9,0 (± 2,7)	< 0,001	0,016	0,048	-0,04	0,08
Calcium, mg/L	83,4 (± 75,8)	86,7 (± 75,6)	62,6 (± 23,8)	77,9 (± 14,0)	0,301	0,149	0,489	0,44	-0,21

¹Modèle linéaire mixte prenant en compte la matrice, la méthode d'analyse et leur interaction comme effet fixe et la truie comme effet aléatoire. ² Coefficient de corrélation de Spearman.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Contreras-Aguilar M.D., Escribano D., Martínez-Miró S., López-Arjona M., Rubio C.P., Martínez-Subiela S., Cerón J.J., Tecles F., 2019. Application of a score for evaluation of pain, distress and discomfort in pigs with lameness and prolapses: correlation with saliva biomarkers and severity of the disease. *Res. Vet. Sci.*, 126, 155-163.
- Contreras-Aguilar M.D., López-Arjona M., Martínez-Miró S., Escribano D., Hernández-Ruipérez F., Cerón J.J., Tecles F., 2021. Changes in saliva analytes during pregnancy, farrowing and lactation in sows: a sialochemistry approach. *Vet. J.*, 273, 1-6.
- Dorioz J.M., Trevisan D., Vansteelant J.Y., 1997. Tranferts diffus de phosphore des bassins versants agricoles vers les lacs : impacts, ordre de grandeur, mécanismes. In : INRA (Eds), *L'eau dans l'espace rural*, 249-264. Paris, France.
- Greze-Capdeville M., Crenshaw T.D., 2021. Evaluation of calcium to phosphorus ratio in spot urine samples as a practical method to monitor phosphorus intake adequacy in sows. *J. Anim. Sci.*, 99, 1-7.
- Kersch-Schindl K., Boschitsch E., Marculescu R., Gruber R., Pietschmann P., 2020. Bone turnover markers in serum but not in saliva correlate with bone mineral density. *Sci. Rep.*, 10, 1-8.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing (Version 4.2. 2). R Foundation for Statistical Computing.