

Recherche de biomarqueurs salivaires du stade de maturité sexuelle de cochettes pré-pubères

Ghylène GOUDET (1), Cécile DOUET (1), Lydie Nadal-DESBARATS (2), Nebahat KÜTÜK SÜER (2), Christophe STAUB (3), Eric VENTURI (3), Jonathan SAVOIE (3), Stéphane FERCHAUD (4), Sylviane BOULOT (5), Armelle PRUNIER (6)

(1) INRA, UMR PRC, 37380 Nouzilly, France

(2) INSERM U930, UFR de médecine, 10bd Tonnellé, 37044 Tours, France

(3) INRA, UEPAO, 37380 Nouzilly, France

(4) INRA, GENESI, Equipe porcine, Le chêne, 86600 Lusignan, France

(5) IFIP, Institut du Porc, 35650 Le Rheu, France

(6) INRA, UMR1348 PEGASE, 35590 St Gilles, France

ghylene.goudet@tours.inra.fr

Avec la collaboration technique de Eric ROYER

Search for salivary biomarkers of sexual development in pre-pubertal gilts.

Effective methods for synchronizing estrus in gilts are crucial for strict implementation of batch management and optimum reproductive performances. Altrenogest treatments are used on a routine basis in pig farms, but there is growing demand for alternative non-hormonal breeding tools. Before puberty, gilts exhibit a “waiting” period, related to ovarian development and gonadotrophin secretions, during which external stimulation, such as boar exposure, could induce the first ovulation. As non-invasive tools are required to increase knowledge about the waiting period, the aim of this work is to search for specific biomarkers of this period in saliva. Trans-abdominal ultrasonography was carried out for 5 weeks in six 140-day old Large White gilts until puberty detection (week -5 to week -1 before puberty). We collected saliva samples as well as urinary samples for estrone assay to detect the waiting period. Gilts were then slaughtered 7 days after puberty detection for puberty confirmation. The salivary metabolome was analyzed using ^1H Nuclear Magnetic Resonance. Urinary estrone assays are in progress. The concentrations of some saliva metabolites significantly increased (propionate and butyrate for example) or decreased (pyruvate and fumarate for example) between week -5 and week -1 before puberty. The identification of other metabolites whose salivary concentration significantly varied is in progress. These results suggest that some salivary metabolites could be biomarkers of the pre-pubertal stage in gilts. Salivary monitoring may help to investigate optimal time for application of boar effect and could contribute to decreasing the number of females mated while they are pre-pubertal.

INTRODUCTION

L'élevage porcin conventionnel se caractérise par une conduite en bandes qui présente de nombreux avantages organisationnels (surveillance des mises-bas, ajustement de la taille des portées, gestion des porcelets...) et sanitaires (nettoyage-désinfection des locaux entre bandes). Des traitements progestatifs à l'aide d'agonistes de synthèse de la progestérone sont administrés par une majorité d'éleveurs pour synchroniser les cycles des cochettes de renouvellement et les intégrer dans les bandes (Boulot *et al.*, 2005). Les interrogations concernant les effets possibles des résidus hormonaux sur la santé humaine et l'environnement conduisent à rechercher des méthodes alternatives de synchronisation dans de nombreuses espèces. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles pratiques d'élevage notamment pour la synchronisation des oestrus des cochettes. Avant la première ovulation, les cochettes atteignent un stade physiologique de pré-puberté au cours duquel une stimulation

externe peut déclencher la première ovulation. L'exposition au verrat (appelée effet mâle) pourrait favoriser le déclenchement et la synchronisation de la puberté s'il est appliqué pendant cette période de pré-puberté (Prunier, 1989). Cette pratique est très peu utilisée en élevage, car le moment optimal et les modalités d'exposition au verrat ne sont pas clairement définis. Notre objectif est de mieux connaître la phase de pré-puberté, et notamment de trouver des biomarqueurs de cette phase. Une meilleure connaissance de la phase de pré-puberté permettra d'améliorer le repérage des femelles à stimuler et de diminuer le nombre de femelles mises à la reproduction alors qu'elles sont impubères.

Les concentrations d'estrone urinaire augmentent pendant la phase de pré-puberté (Camous *et al.*, 1985). En conditions d'élevage où les cochettes sont logées en groupe, des prélèvements d'urine réguliers ne sont pas envisageables et les dosages hormonaux classiques reposent sur des prélèvements sanguins trop invasifs. En revanche, le suivi d'indicateurs salivaires suscite un intérêt croissant en raison de son caractère non invasif.

Nous souhaitons donc rechercher des biomarqueurs de la phase de pré-puberté dans la salive, ce type de prélèvement étant réalisable en élevage.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Prélèvements des échantillons

Neuf cochettes Large White ont été utilisées pendant 5 semaines, de 140 jours d'âge jusqu'à la puberté (semaine -5 à semaine -1 avant la puberté). Elles étaient logées ensemble, sans changement de salle ni de nourriture et sans contact avec un mâle pendant l'étude. L'utérus et les ovaires ont été examinés par échographie (échographe Esaote-Piemedical MyLab30 Vet Gold sonde 3-10 Mhz) trois fois par semaine afin de détecter la puberté (Martinat-Botté *et al.*, 2003 ; Boulot *et al.*, 2006). De 140 jours à la détection de puberté, nous avons réalisé trois fois par semaine des prélèvements d'urine pour doser l'estrone et identifier la phase de pré-puberté, et des prélèvements de salive à l'aide d'une salivette (Sarstedt) pour rechercher des biomarqueurs de cette phase.

Les prélèvements ont été centrifugés et conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Sept jours après la détection de puberté, les cochettes ont été abattues pour confirmer la puberté en vérifiant l'état des ovaires et de l'utérus.

1.2. Analyse des échantillons

Des biomarqueurs salivaires ont été recherchés parmi les molécules de faible poids moléculaire en réalisant une étude du métabolome par Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton. La salive a été diluée dans un tampon phosphate deutéré additionné de TSP (acide triméthylsilylpropanoïque) qui sert de référence.

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un spectromètre (500MHz UltraShield, Bruker). Les spectres obtenus ont été analysés avec le logiciel SIMCA P+ (analyse statistique multivariée supervisée et non supervisée). Les dosages d'estrone dans l'urine sont en cours.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons pu collecter des échantillons de salive sur les 9 cochettes trois fois par semaine, à raison de 550 µl à 2,25 ml après centrifugation. Pour six cochettes, la puberté a été détectée par échographie à 182, 189, 190, 190, 191 et 192 jours (utérus développé et ovulation récente), et elle a été confirmée après abattage. Pour deux cochettes considérées pubères à l'échographie, la puberté n'a pas été confirmée à l'abattage. Une cochette considérée pubère à l'échographie était en réalité dans son 2^{ème} cycle (présence de corps jaunes d'un cycle précédent). Les prélèvements salivaires de ces trois cochettes n'ont pas été analysés. Pour les six autres cochettes, nous avons analysé un échantillon de salive par semaine, de la semaine -5 à la semaine -1 avant la puberté.

La Figure 1 montre un exemple de spectres RMN obtenus sur l'une des cochettes au cours des 5 semaines de suivi.

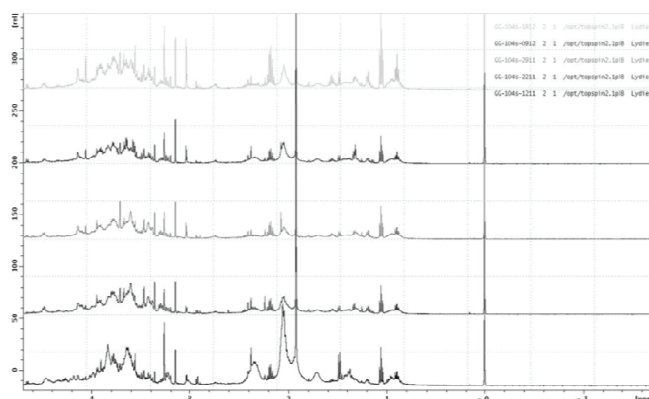


Figure 1 – Spectres RMN obtenus sur l'une des cochettes au cours des semaines -5 (en bas) à -1 (en haut)

L'analyse statistique a permis de mettre en évidence une différence de concentrations pour certains métabolites entre les semaines -5 et -1 ($P < 0,05$, Figure 2). C'est par exemple le cas pour le propionate et le butyrate dont la concentration est plus élevée en semaine -1 vs semaine -5, ou le pyruvate et le fumarate dont la concentration est plus faible en semaine -1 vs semaine -5. Plusieurs métabolites restent à identifier.

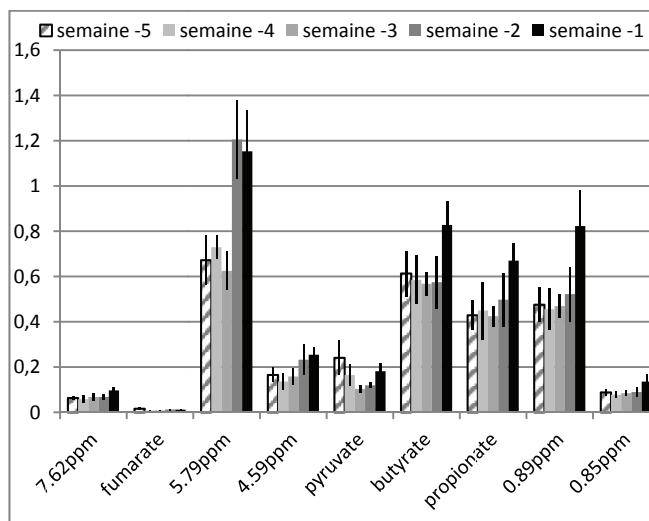


Figure 2 – Evolution des concentrations (exprimées en mM \pm sem dans le tube RMN) des métabolites d'intérêt pendant la phase de pré-puberté des six cochettes. Les zones signalées par un chiffre sont en cours d'identification.

CONCLUSION

Ce travail original suggère que des métabolites d'intérêt, dont la concentration salivaire varie au cours des 5 semaines précédant la puberté, pourraient être des biomarqueurs de la pré-puberté chez la cochette. Ces premiers résultats prospectifs doivent être confirmés afin de préciser si ces variations sont bien spécifiques de la maturation pubertaire et si des niveaux seuils peuvent être mis en évidence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boulot S., Dubroca S., Badouard B., 2005. Gestion pharmacologique de la reproduction. Techniporc, 28 (5), 9-12.
- Boulot S., Morvan R., Martinat-Botté F., 2006. Conditions de mise en œuvre et intérêt du contrôle échographique de puberté en élevage porcin. Journées Rech. Porcine, 38, 475-482.
- Camous S., Prunier A., Pelletier J., 1985. Plasma prolactin, LH, FSH and estrogen excretion patterns in gilts. J. Anim. Sci., 60, 1308-1317.
- Martinat-Botté F., Royer E., Venturi E., Boisseau C., Guillouet P., Furstoss V., Terqui M., 2003. Determination by echography of uterine changes around puberty in gilts and evaluation of a diagnosis of puberty. Reprod. Nutr. Dev., 43, 225-236.
- Prunier A., 1989. Influence de la présentation au verrat sur l'âge à la puberté des truies. INRA Prod. Anim., 2, 65-72.