

# Mesure des concentrations de stéroïdes dans la salive de cochettes immatures, pré-pubères et pubères

Ghylène GOUDET (1), Philippe LIERE (2), Cécile DOUET (1), Jonathan SAVOIE (3), Christophe STAUB (3), Eric VENTURI (3), Stéphane FERCHAUD (4), Sylviane BOULOT (5), Armelle PRUNIER (6)

(1) PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

(2) U1195-INSERM-Université Paris Sud, 94276 Kremlin Bicêtre, France

(3) PAO, INRA, 37380 Nouzilly, France

(4) GENESI, INRA, 17700 Surgères, France

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

(6) PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

ghylene.goudet@inra.fr

Avec la collaboration technique de Eric ROYER (PAO, INRA, 37380 Nouzilly, France)

## Evaluation of steroids concentrations in the saliva of immature, prepubertal and pubertal gilts.

Synchronizing oestrus in gilts is an important tool for pig producers to optimize the management of reproduction. Synthetic progestogens are used routinely in pig farms for this purpose, but there is a need for alternative non-hormonal breeding tools. Before puberty, gilts exhibit a “waiting period”, related to ovarian development and gonadotrophin secretions, during which an external stimulation, such as boar exposure, could induce and synchronize the first ovulation. Our aim was to characterize this “waiting period” and search for biomarkers of this period using non-invasive tools. During this period, an increase of urinary oestrone concentration has been observed, but urinary sampling is difficult in group-housed females. Salivary samples are non-invasive and easier to perform. Thus, the aim of this study was to evaluate steroid concentrations in the saliva of immature to pubertal gilts in order to search for biomarkers of the “waiting period”. Trans-abdominal ultrasonographies were performed over a period of 5 weeks on six 140-day-old Large White gilts until puberty detection. Urinary samples were collected for oestrone assay to detect the “waiting period”. Salivary samples were collected for steroidome analysis using gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry to detect potential biomarkers of the “waiting period”. Urinary oestrone concentration increased 2 weeks before puberty. Steroidome analysis allowed the quantification of 28 steroids, 13 of them showing significant differences between weeks. Dehydroepiandrosterone concentrations decreased and estradiol-17 $\beta$  concentrations increased significantly just before the “waiting period”. These steroids could be biomarkers of this period. Present results confirm that non-invasive salivary samples could allow the identification of the physiological status of the gilts and the optimal time for application of the boar effect.

## INTRODUCTION

L'élevage porcin conventionnel se caractérise par une conduite en bandes qui présente de nombreux avantages techniques (surveillance des mises-bas, ajustement de la taille des portées, gestion des porcelets...) et sanitaires (nettoyage-désinfection des locaux entre bandes). Une majorité d'éleveurs administrent des agonistes de synthèse de la progestérone pour synchroniser les cycles des cochettes de renouvellement et les intégrer dans les bandes (Boulot *et al.*, 2005). Les effets négatifs des résidus hormonaux sur la santé humaine et l'environnement conduisent à mettre en place de nouvelles pratiques d'élevage. Notre objectif à long terme est de développer des alternatives aux traitements hormonaux pour la synchronisation des oestrus des cochettes, notamment lors de l'entrée dans la première bande.

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 si elle est appliquée 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 caractériser la phase de pré-puberté et de rechercher des biomarqueurs de cette phase à l'aide de techniques non-invasives.

Pendant la phase de pré-puberté, les concentrations d'oestrone urinaire augmentent (Camous *et al.*, 1985). En conditions d'élevage avec logement en groupe, des prélèvements réguliers d'urine sont difficilement envisageables. Les dosages hormonaux classiques reposent sur des prélèvements sanguins trop invasifs. En revanche, le suivi de biomarqueurs salivaires

est non invasif et relativement facile à mettre en place. La recherche de biomarqueurs salivaires 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.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Prélèvements des échantillons

Six cochettes Large White ont été utilisées pendant cinq 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 ou de régime alimentaire et sans contact avec un mâle. Trois fois par semaine, l'utérus et les ovaires étaient examinés par échographie afin de détecter la puberté (Martinat-Botté *et al.*, 2003), des prélèvements individuels d'urine étaient réalisés pour doser l'œstrone et identifier la phase de pré-puberté et des prélèvements de salive étaient réalisés à l'aide d'une salivette (Starstedt) pour rechercher des biomarqueurs de cette phase. Les prélèvements étaient conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Sept jours après détection de la puberté (utérus développé et présence d'ovulations), les cochettes étaient abattues pour confirmer la puberté en vérifiant l'état des ovaires et de l'utérus.

### 1.2. Analyse des échantillons

Les concentrations d'œstrone urinaire ont été dosées à l'aide du kit DetectX-Estrone-3-sulfate enzyme immunoassay (Arbor Assays) et rapportées aux concentrations de créatinine (dosées avec le kit Creatinine Assay de R&D Systems) afin de prendre en compte la dilution de l'urine.

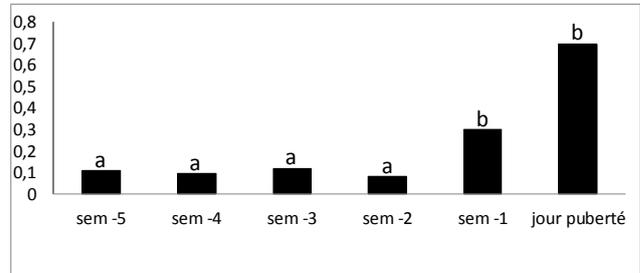
Le microdosage des stéroïdes dans la salive a été réalisé par GC/MS/MS (Gas Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry) afin d'obtenir un profil stéroïdien salivaire de 140 jours d'âge jusqu'à la puberté.

La comparaison des concentrations entre les semaines a été réalisée avec le logiciel R (test non paramétrique par la méthode des permutations) et par une ANOVA à un facteur suivie du test de comparaisons multiples de Tukey.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

La puberté a été détectée par échographie à 182, 189, 190, 190, 191 et 192 jours et elle a été confirmée après abattage. Les échantillons d'urine ont pu être collectés environ une fois sur deux. Les prélèvements de salive ont tous permis d'obtenir 0,5 à 2,25 ml de salive après centrifugation de la salivette. Nous avons analysé un échantillon d'urine et de salive par semaine, de la semaine -5 à la semaine -1 avant la puberté.

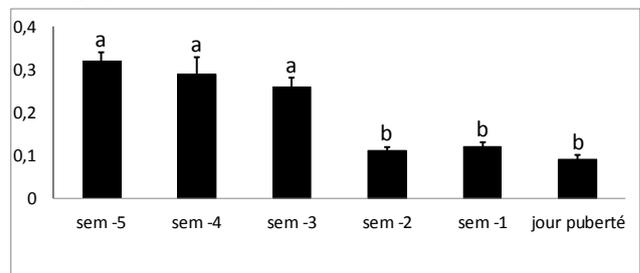
La figure 1 montre l'évolution de la concentration urinaire moyenne d'œstrone au cours des cinq semaines de suivi. L'analyse statistique a mis en évidence une augmentation ( $P < 0,05$ ) des concentrations d'œstrone dans les deux semaines précédant la puberté, ce qui permet d'identifier la phase de pré-puberté.



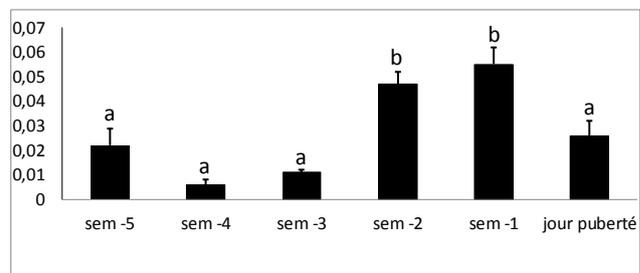
**Figure 1** – Concentration urinaire d'œstrone /créatinine de la semaine -5 au jour de détection de la puberté

L'analyse en GC/MS/MS a permis de quantifier 28 stéroïdes dans la salive, dont 13 présentaient des variations significatives de leur concentration entre 140 jours d'âge et la puberté. En particulier, la déhydroépiandrostérone (DHEA) et le 17β-œstradiol (E2) présentaient des variations significatives autour de l'entrée dans la phase de pré-puberté (Figures 2 et 3). L'analyse statistique a mis en évidence une baisse significative de la concentration de DHEA et une augmentation significative de la concentration d'E2 avant l'entrée dans la phase de pré-puberté.

( $P < 0,001$  ; a,b : les histogrammes avec des lettres différentes sont significativement différents).



**Figure 2** – Concentration salivaire de DHEA (ng/ml ± SEM) de la semaine -5 au jour de détection de la puberté



**Figure 3** – Concentration salivaire d'E2 (ng/ml ± SEM) de la semaine -5 au jour de détection de la puberté

## CONCLUSION

L'E2 et la DHEA pourraient être des biomarqueurs de la phase de pré-puberté. Ce travail confirme que des prélèvements salivaires non invasifs pourraient permettre un repérage du stade physiologique des cochettes. 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, vol 28, n°5, 9-12.
- 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.