

# Analyse des stéroïdes dans la salive de cochettes pour identifier des biomarqueurs de la période de réceptivité à l'effet mâle

Ghylene GOUDET (1), Philippe LIERE (2), Doryan GRIVault (3), Cécile DOUET (1), Jonathan SAVOIE (4), Stéphane FERCHAUD (3), Florence MAUPERTUIS (5), Antoine ROINSARD (6), Sylviane BOULOT (7), Armelle PRUNIER (8)

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

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

(3) GENESI, INRA, 17700, Surgères, France

(4) PAO, INRA, 37380, Nouzilly, France

(5) Chambre d'agriculture Pays de la Loire, 44150 Ancenis, France

(6) ITAB, 49105 Angers, France

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

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

ghylene.goudet@inra.fr

## Analysis of steroids in gilt saliva to identify biomarkers of the period of receptivity to the boar effect

Our objective was to develop alternatives to hormonal treatments to synchronize oestrus of gilts. Before puberty, gilts experience a pre-puberty period during which boar exposure could induce and synchronize the first ovulation. To develop practical non-invasive tools to identify this period and improve detection of the gilts to stimulate, we searched for salivary biomarkers of the pre-puberty period. Saliva samples were collected from 30 Large-White x Landrace crossbred gilts from 140 to 175 days of age. Gilts were exposed to a boar twice a day and subjected to oestrus detection from 150 to 175 days of age. They were then slaughtered to ascertain puberty. Among the 30 gilts, 10 were detected in oestrus 4 to 7 days after introduction of the boar and were considered receptive to the boar effect, 14 were detected in oestrus more than 8 days after boar introduction, six did not show oestrus before slaughter and were considered non-receptive. Salivary steroidome analysis was performed for six receptive and six non-receptive gilts using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Four saliva samples per gilt were analysed: 26 days and 11 days before boar introduction (day0-26 and day0-11), the day of boar introduction (day0), 3 days later for receptive gilts (day0+3) or 7 days later for non-receptive gilts (day0+7). Saliva analysis detected 30 steroids. The concentrations of six of them were higher ( $P < 0.05$ ) in receptive gilts than in non-receptive gilts at day0-26 (progesterone), day0-11 ( $3\alpha5\beta20\alpha$ -hexahydroprogesterone,  $3\beta5\alpha20\beta$ -hexahydroprogesterone, dehydroepiandrosterone, androstenediol) and day0 ( $3\beta5\alpha$ -tetrahydroprogesterone). Their low and variable concentrations in saliva require expensive analysis and limit their use in pig farms. However, progesterone could be an interesting biomarker of the pre-puberty period.

## INTRODUCTION

L'élevage porcin conventionnel se caractérise par une conduite en bandes qui présente de nombreux avantages pour la gestion des animaux (inséminations, surveillance des mises-bas, ajustement de la taille des portées, soins aux porcelets), l'organisation de l'élevage (utilisation optimale des bâtiments, nettoyage des locaux entre bandes) et la production de lots de porcelets homogènes pour l'engraissement et l'abattage. La conduite en bandes nécessite la synchronisation des cycles des femelles, réalisée par administration d'agonistes de synthèse de la progestérone chez une majorité d'éleveurs. 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 œstrus des cochettes, notamment lors

de l'entrée dans la première bande. Avant la puberté, les cochettes atteignent une phase de pré-puberté au cours de laquelle une stimulation externe peut déclencher la première ovulation (Prunier, 1989). L'exposition au verrat (appelée effet mâle) pourrait favoriser le déclenchement et la synchronisation de la première ovulation si elle est appliquée pendant cette phase de pré-puberté. Notre objectif est d'améliorer le repérage des femelles à stimuler en identifiant des biomarqueurs de la phase de pré-puberté. Ces biomarqueurs sont recherchés dans la salive des cochettes car les prélèvements de salive sont non-invasifs.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Prélèvements des échantillons

Des échantillons de salive ont été prélevés deux fois par semaine à l'aide d'une salivette (Starstedt, Nümbrecht,

Allemagne) sur 30 cochettes Large-White x Landrace de 140 à 175 jours d'âge. De 150 à 175 jours d'âge, les cochettes ont été exposées à un verrat deux fois par jour pendant cinq minutes et soumises à une détection des chaleurs par le test d'immobilisation. A 175 jours, les cochettes ont été abattues pour confirmer la puberté en analysant l'état des ovaires et de l'utérus.

### 1.2. Analyse des échantillons

Le microdosage des stéroïdes a été réalisé dans 500 µL de salive par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem afin d'obtenir un profil stéroïdien salivaire des cochettes ayant répondu ou non à l'effet mâle. Les concentrations ont été comparées par ANOVA bidirectionnelle avec mesures répétées appariées dans le temps avec le logiciel GraphPad Prism6.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Parmi les 30 cochettes exposées au verrat, 10 ont été détectées en chaleurs 4 à 7 jours après l'introduction du mâle, elles étaient donc réceptives à l'effet mâle. Par ailleurs, 14 cochettes ont été détectées en chaleurs plus de 8 jours après l'introduction du mâle et six n'ont jamais été détectées en chaleur et étaient impubères lors de l'abattage. Ces cochettes ont été considérées comme non-réceptives à l'effet mâle. Le microdosage des stéroïdes dans la salive a été réalisé pour les six cochettes réceptives à l'effet mâle détectées en chaleur 5 jours après le début de l'effet mâle, et les six cochettes non réceptives à l'effet mâle encore impubères lors de l'abattage. Pour chaque cochette, quatre prélèvements de salive ont été analysés : 1) 26 jours avant l'exposition au mâle (E-26), 2) 11 jours avant l'exposition au mâle (E-11), 3) le premier jour de l'exposition au mâle (E), 4) 3 jours après l'exposition au mâle

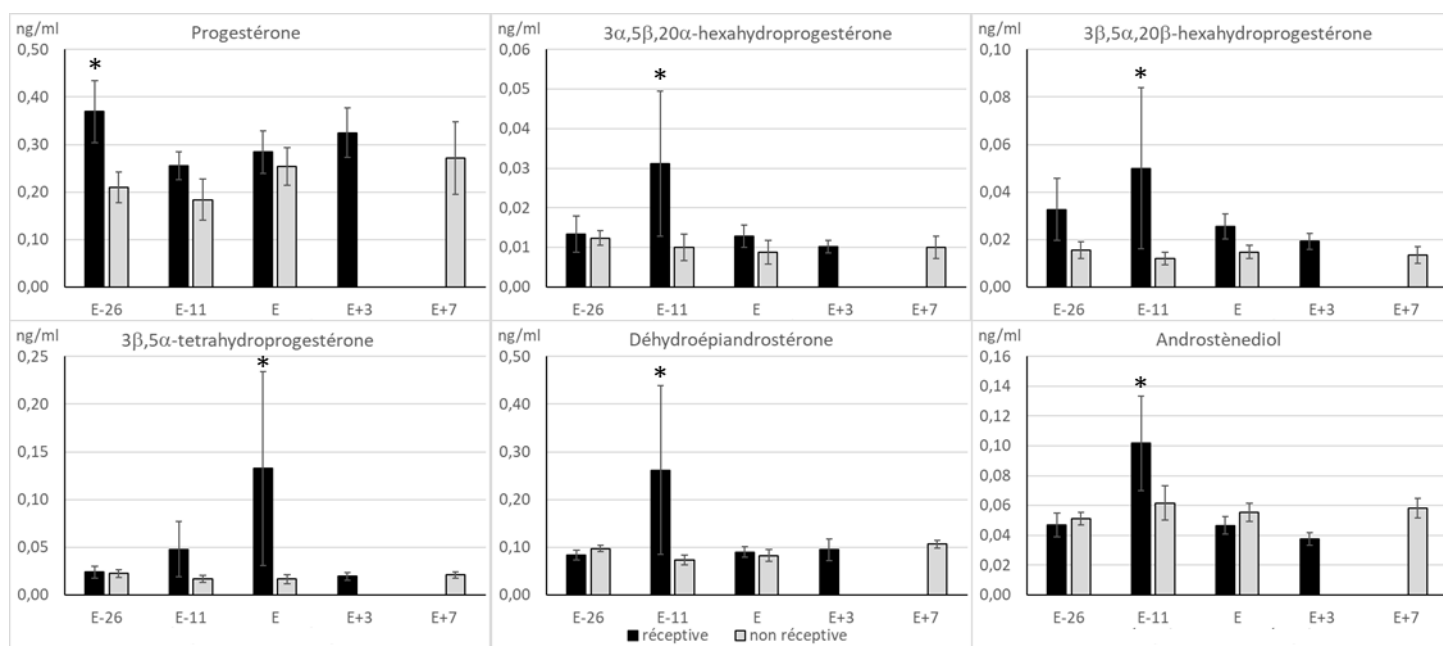
pour les six cochettes réceptives à l'effet mâle (E+3) ou 7 jours après pour les 6 cochettes non réceptives à l'effet mâle (E+7).

Le microdosage a permis d'identifier et de quantifier 30 stéroïdes dans la salive. Parmi eux, six stéroïdes présentaient des concentrations significativement différentes entre les cochettes réceptives et non réceptives à l'effet mâle. La figure 1 présente l'évolution des concentrations de ces six stéroïdes. La salive des cochettes réceptives à l'effet mâle contenait des concentrations plus élevées en progestérone 26 jours avant l'exposition au mâle, en 3α5β20α-hexahydroprogestérone, 3β5α20β-hexahydroprogestérone, déhydroépiandrostérone et androstènediol 11 jours avant l'exposition au mâle, et en 3β5α-tetrahydroprogestérone le premier jour de l'exposition au mâle.

Le dosage de ces stéroïdes dans la salive pourrait donc permettre de différencier les cochettes qui seront réceptives à l'effet mâle 11 à 26 jours avant l'exposition au mâle et ainsi améliorer le repérage des cochettes à stimuler. Toutefois, les concentrations salivaires des cochettes réceptives sont très variables et la différence avec les cochettes non réceptives est relativement faible. De plus, les taux salivaires très faibles nécessitent une méthode d'analyse complexe et coûteuse, qui limite l'utilisation de ces biomarqueurs en élevage. La progestérone pourrait toutefois être un biomarqueur potentiellement intéressant.

## CONCLUSION

Ce travail confirme la nécessité d'améliorer le repérage des femelles à stimuler avant l'exposition au verrat. Il montre que des prélèvements non-invasifs de salive permettent d'analyser l'état physiologique des cochettes. Il a permis d'identifier des biomarqueurs salivaires de la réceptivité à l'effet mâle, parmi lesquels la progestérone pourrait être intéressante.



**Figure 1** – Concentrations en stéroïdes dans la salive des six cochettes réceptives et des six cochettes non réceptives à l'effet mâle  
Moyenne ± erreur-type ; \* : différence significative entre cochettes réceptives vs non réceptives (P < 0,05).

## REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Prunier A., 1989. Influence de la présentation au verrat sur l'âge à la puberté des truies. INRA Prod. Anim., 2, 65-72.