

Recherche de biomarqueurs urinaires du moment optimal d'exposition à l'effet mâle

Ghylène Goudet, Cécile Douet, Lydie Nadal-Desbarats, Nassima Haifi, Christophe Staub, Eric Venturi, Jonathan Savoie, Stéphane Ferchaud, Sylviane Boulot, Armelle Prunier

▶ **To cite this version:**

Ghylène Goudet, Cécile Douet, Lydie Nadal-Desbarats, Nassima Haifi, Christophe Staub, et al.. Recherche de biomarqueurs urinaires du moment optimal d'exposition à l'effet mâle. 48. Journées de la Recherche Porcine, Feb 2016, Paris, France. IFIP - Institut du Porc, Journées de la Recherche Porcine en France, 2016, 48èmes Journées de la Recherche Porcine. hal-02743464

HAL Id: hal-02743464
https://hal.inrae.fr/hal-02743464

Submitted on 3 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

2016. Journées Recherche Porcine, 48, 251-252.

Recherche de biomarqueurs urinaires du moment optimal d'exposition à l'effet mâle

Ghylène GOUDET (1), Cécile DOUET (1), Lydie NADAL-DESBARATS (2), Nassima HAIFI (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 1079, UMR SENAH, 35590 St Gilles, France

ghylene.goudet@tours.inra.fr

Avec la collaboration technique de Eric ROYER

Search for urinary biomarkers for optimal application of male effect.

Effective methods for synchronizing oestrus in gilts are crucial for 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 urinary oestrone concentration increase. During this "waiting period", an 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 urine. Trans-abdominal ultrasonographies were carried out for 5 weeks in six 140 days old Large White gilts until puberty detection (week -5 to week -1 before puberty). Urinary samples were collected for oestrone assay and metabolome analysis using ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance. Gilts were then slaughtered 7 days after puberty detection for puberty confirmation. Urinary oestrone concentration increases from week -2 to the day of puberty detection. Metabolome analysis allows the identification of 78 spectral bins, 8 of them showing significant differences between weeks. Metabolites whose concentration significantly increase or decrease during the "waiting period" (such as Trigonelline, N-acetyl-X…) could be interesting biomarkers of this period. These results confirm that non invasive urinary samples could make it possible to detect optimal time for application of boar effect. Potential urinary biomarkers of this period have been identified. This 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 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 augmentation des concentrations d'estrone urinaire est observée (Camous *et al.,* 1985). Pendant la phase de pré-puberté, 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. L'objectif de cette étude est de mieux caractériser la phase de pré-puberté, et de rechercher des biomarqueurs de cette phase dans l'urine. 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.

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 ou de régime alimentaire et sans contact avec un mâle. 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 prélèvements individuels d'urine par semaine pour doser l'estrone et rechercher des biomarqueurs de la phase de pré-puberté. Les prélèvements ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Sept jours après détection de la puberté (utérus développé et présence d'ovulations), les cochettes ont été abattues pour confirmer la puberté en vérifiant l'état des ovaires et de l'utérus.

1.2. Analyse des échantillons

Les concentrations d'estrone 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.

Les biomarqueurs urinaires ont été recherchés parmi les molécules de faible poids moléculaire en réalisant une étude du métabolome par Spectroscopie à Résonance Magnétique du proton (SRM). L'urine 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 (600MHz UltraShield, Bruker). Les spectres obtenus ont été analysés avec le logiciel SIMCA P+ (analyse statistique multivariée supervisée et non supervisée). Pour chaque métabolite, la comparaison des concentrations entre les semaines a été réalisée avec le logiciel R (test non paramétrique par la méthode des permutations).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons tenté de collecter des échantillons d'urine sur les neuf cochettes trois fois par semaine et nous avons obtenu un échantillon environ une fois sur deux. Pour six cochettes, la puberté a été détectée par échographie à 182, 189, 190, 190, 191 et 192 jours d'âge (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 dernière cochette était en réalité dans son 2ème cycle à l'abattage (présence de corps jaunes d'un cycle précédent). Les prélèvements d'urine de ces trois cochettes, n'ont pas été analysés. Pour les six autres cochettes, nous avons analysé un échantillon d'urine par semaine, de la semaine -5 à la semaine -1 avant la puberté. La Figure 1 montre l'évolution de la concentration moyenne d'estrone au cours des 5 semaines de suivi.

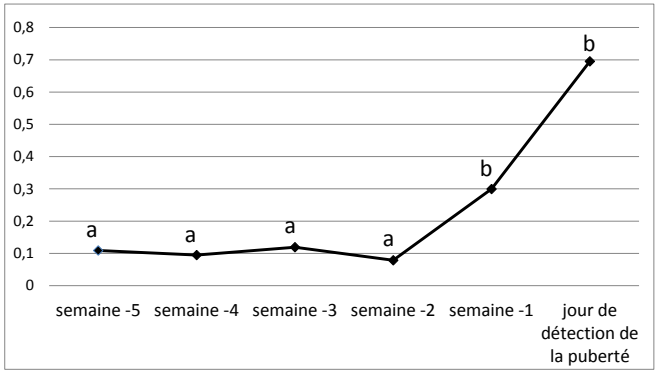


Figure 1 – Concentration moyenne d'estrone/créatinine de la semaine -5 au jour de détection de la puberté

L'analyse statistique a permis de mettre en évidence une augmentation significative des concentrations d'estrone dans les deux semaines précédant la puberté, ce qui permet d'identifier la phase de pré-puberté.

L'analyse en SRM a permis d'identifier 78 zones spectrales. Parmi les métabolites détectés, les concentrations de huit métabolites présentaient des différences significatives entre les semaines (Figure 2). Les métabolites signalés par un chiffre restent à identifier.

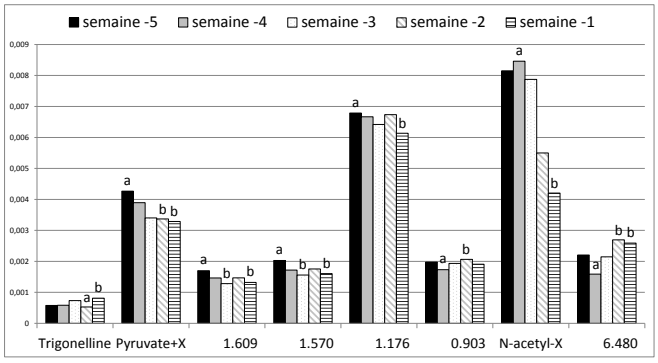


Figure 2 – Concentrations des métabolites d'intérêt (en mM par tube) des semaines -5 à -1 pour les 6 cochettes

Les métabolites dont la concentration évolue significativement lors de la phase de pré-puberté (Trigonelline, N-acetyl-X, 6.480) pourraient être des biomarqueurs de cette phase.

CONCLUSION

Ce travail confirme que des prélèvements urinaires non invasifs pourraient permettre un repérage de la phase de pré-puberté des cochettes. Des métabolites d'intérêt qui pourraient être des biomarqueurs de cette phase ont été identifiés. 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.
- 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., RoyerE., 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 Productions Animales 2, 65-72.