

ifce

institut français
du **cheval**
et de l'**équitation**



43^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 16 mars 2017

Effets du stress induit par le sevrage sur les indicateurs biologiques et transcriptomiques du stress chez les équins : Analyse comparative d'un sevrage progressif et d'un sevrage brutal

A. Foury¹², L. Lansade³⁴⁵⁶, M. Vidament³⁴⁵⁶, F. Lévy³⁴⁵⁶, J-M. Yvon³⁴⁵⁶, F. Reigner⁷, N. Mach⁸, M-P. Moisan¹²

¹ INRA, UMR1286 Nutrition et Neurobiologie Intégrée, Bordeaux, France

² Université de Bordeaux, UMR1286 Nutrition et Neurobiologie Intégrée, Bordeaux, France

³ INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France,

⁴ CNRS, UMR7247 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France,

⁵ Université François Rabelais de Tours, Tours, France,

⁶ Ifce, Nouzilly, France

⁷ INRA UE1297 Physiologie Animale de l'Orfrasière, Nouzilly, France

⁸ INRA UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-Josas, France

Résumé

Le sevrage artificiel peut engendrer stress, perte d'état physique et apparition de stéréotypies. Pour limiter ces problèmes, certains éleveurs sèvent les poulains progressivement. Cet article présente les effets d'un sevrage progressif sur différents paramètres physiologiques (cortisol, protéine C réactive, longueur des télomères) et sur le transcriptome sanguin, à la fois chez les poulains et chez les mères. Les résultats indiquent qu'un sevrage progressif a des effets bénéfiques chez les poulains à court terme, et qu'à plus long terme les poulains sevrés brutalement auraient compensés cet écart. Chez les mères, les effets bénéfiques du sevrage progressif sont moins marqués.

Mots clés : Cheval – Sevrage – Stress – Cortisol – Télomères – Transcriptomique

Summary

The weaning process has been identified as being associated with stress, weight loss and stereotypies. To limit these problems, some breeders wean the foals gradually. This article presents the effects of a progressive weaning on various physiological parameters (cortisol, C reactive protein, length of telomeres) and on the blood transcriptome, among the foals and the mares. Results indicate that a progressive weaning has beneficial short-term effects in foals, and that in the longer term the foals weaned abruptly have compensated this gap. In mothers, the beneficial effects of the progressive weaning are less important.

Key-words : Horse – Weaning – Stress – Cortisol – Telomeres – Transcriptomic



Introduction

A l'état naturel, le poulain est généralement sevré vers 10 mois quand la mère va de nouveau mettre bas, mais il reste ensuite auprès d'elle jusqu'à sa puberté. En élevage, les poulains sont le plus souvent séparés totalement de leur mère vers six mois, plus tôt parfois, et sans aucune préparation. Ce sevrage artificiel et précoce entraîne un stress important, une perte d'état physique, voire l'apparition de stéréotypies. En prévention, certains éleveurs habituent progressivement les poulains à se séparer de leur mère et d'après eux, cette pratique permet de limiter considérablement le stress du sevrage.

L'objectif du projet est de déterminer si cette technique de sevrage progressif permet de diminuer le stress chez le poulain, mais également chez la jument. L'originalité de ce projet est d'évaluer les effets du sevrage sur le stress et le bien-être par des observations comportementales, mais aussi par des indicateurs biologiques et une approche transcriptomique (quantification de l'ensemble des ARN messagers présents dans un tissu afin d'identifier les gènes actifs), permettant de fournir une signature biologique globale des effets du stress. Les résultats comportementaux ont été présentés en 2016 aux Journées de la Recherche Équine (Lansade *et al.*, 2016). Nous présentons ici les résultats des indicateurs biologiques et de l'approche transcriptomique.

1 Matériel et Méthodes

1.1 Animaux

Le protocole expérimental mis en place pour cette étude est détaillé dans l'article de Lansade *et al.* (2016).

En bref, 34 couples mères/jeunes de race Welsh ont été étudiés. Ils étaient répartis en deux groupes équilibrés en fonction de l'âge, du sexe, du père et de la parité de la mère. Le groupe « Sevrage Progressif » (groupe P) était constitué de 18 poulains et de leurs mères respectives. Les poulains ont été séparés quotidiennement des mères à l'aide d'une barrière à claire voie, pendant le mois précédent le sevrage définitif (à partir de J-28), pour des durées croissantes dans le temps. Le groupe « Sevrage Brutal » (groupe B) était constitué de 16 poulains et de leurs mères respectives. Les poulains sont restés en permanence avec leurs mères jusqu'au jour du sevrage (J0). Tous les autres paramètres étaient strictement identiques entre les groupes (temps de manipulation, alimentation, sorties, espace disponible).

1.2 Prélèvements salivaires

La salive a été prélevée avant et après le jour du sevrage. Ainsi, à J-73, J-28, J+1 et J+30, un échantillon de salive des juments et des poulains a été prélevé grâce à une Salivette (Sarstedt, Allemagne). Les échantillons sont ensuite centrifugés et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse grâce au kit Cortisol Saliva ELISA (IBL International, Allemagne).

1.3 Prélèvements sanguins

Le sang a été prélevé chez les juments et leurs poulains au niveau de la jugulaire dans des tubes de prélèvements sous-vide EDTA à J-119, J-73, J-31, J+30 et J+95. Les tubes sont ensuite centrifugés et le plasma est conservé à -20°C jusqu'à analyse. Les niveaux de Protéine C Réactive (CRP, marqueur biologique de la réaction inflammatoire) ont été mesurés grâce au kit Horse CRP ELISA (Kamiya Biomedical Company, USA). Pour les prélèvements à J-73 et J+95, les culots de cellules sanguines obtenus après centrifugation ont été conservés à -20°C. L'ADN génomique a été extrait de ces culots de cellules sanguines, puis la séquence télomérique (séquence TTAGGG répétée à l'extrémité des chromosomes ayant un rôle protecteur des chromosomes) et un gène à copie unique (interféron gamma) ont été amplifiés par PCR quantitative (amplification de l'ADN *in vitro*). Le rapport T/S (amplification séquence répétée (T)/amplification gène copie simple (S)) ensuite calculé correspond à la longueur des télomères d'un échantillon relative à un échantillon de référence.

Pour l'analyse transcriptomique, le sang a été prélevé à la veine jugulaire à J+30 et J+95 chez les poulains et chez les juments dans des tubes sous vides qui contiennent un réactif stabilisant immédiatement l'ARN intracellulaire (tubes PAXgene® Blood RNA, PreAnalytiX, Suisse). Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ARN grâce au kit PAXgene® Blood RNA (PreAnalytiX, Suisse) selon le protocole du fournisseur.



1.4 Analyses transcriptomiques, statistiques et bioinformatiques

A partir des ARN extraits, l'analyse de l'expression des gènes a été réalisée par la plateforme GeT-TRiX de l'INRA de Toulouse sur une puce Agilent 60K (Design 081421) incluant 43 987 sondes d'ADN complémentaire équin. Chaque échantillon (ADNc d'1 animal) a été hybridé sur la puce conformément au protocole One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technologies). L'annotation de la puce par Agilent étant incomplète, nous l'avons augmenté grâce à l'annotation automatique fournie par le site SigReannot-mart (<http://www.sigenae.org>) puis par analyses BLAST jusqu'à obtenir 74% des sondes annotées, ce qui représente 15 048 gènes uniques. Les gènes différentiellement exprimés entre les 2 groupes P et B ont ensuite été identifiés après normalisation des données.

Afin d'identifier les voies de signalisation moléculaire qui contrôlent en amont la transcription et qui modifient ainsi l'expression des gènes, nous avons utilisé l'analyse Single Site Analysis (SSA) du logiciel oPOSSUM (Kwon *et al.*, 2012). Cette analyse permet de déterminer la sur-représentation des motifs de liaison à des facteurs de transcription (transcription factor binding motifs, TFBMs) dans les promoteurs d'une liste de gènes. Les TFBMs sont définis à partir de la base de données JASPAR chez l'homme. Les analyses utilisées ont permis d'identifier les TFBMs dans les promoteurs des gènes activés chez les chevaux des groupes « Sevrage Brutal » et « Sevrage Progressif ».

2 Résultats

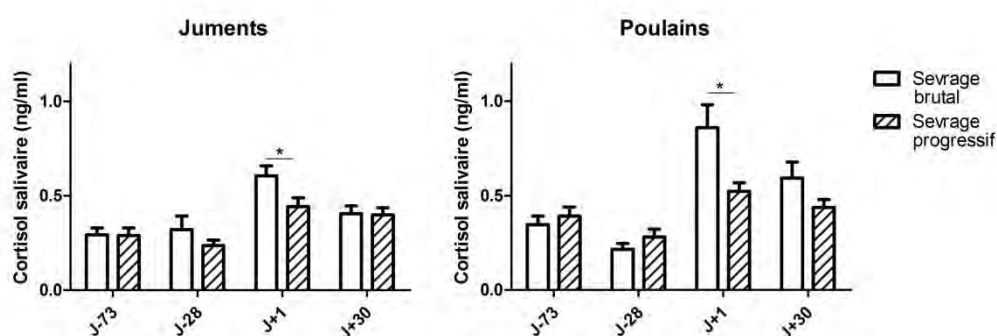
2.1 Résultats physiologiques : cortisol salivaire, CRP plasmatique et longueur des télomères

Le cortisol salivaire, la CRP plasmatique et la longueur des télomères sont des indicateurs de stress. En effet, en situation de stress et/ou inflammatoire, les niveaux de cortisol et de CRP augmentent et la longueur des télomères est raccourcie.

Conformément aux mesures comportementales présentées par Lansade *et al.* (2016), les niveaux de cortisol salivaire suggèrent que les séparations progressives qui précèdent le sevrage définitif n'induisent pas de stress particulier, ni pour les juments ni pour les poulains du groupe P (figure 1). De même, les effets bénéfiques du sevrage progressif observés chez les poulains le jour du sevrage définitif sont confirmés puisque les taux salivaires de cortisol sont moins importants pour les poulains du groupe P par rapport au groupe B. Trente jours après le sevrage, il n'y plus de différence significative entre les 2 groupes.

Contrairement aux résultats comportementaux qui n'avaient montré aucune différence entre les 2 groupes expérimentaux chez les juments, le lendemain du sevrage, les taux de cortisol salivaire semblent indiquer que les juments séparées progressivement de leur poulain sont moins stressées que celles séparées brutalement de leur poulain. Cette différence ne persiste pas 30 jours après le sevrage.

Figure 1 : Niveaux de cortisol salivaire chez les juments et les poulains
Figure 1: Saliva cortisol levels in mares and foals



Chez les poulains, les taux plasmatiques de CRP sont constants au cours du temps et identiques entre les 2 groupes expérimentaux (données comprises entre 5.80 ± 1.29 ng/ml et 7.18 ± 1.65 ng/ml). Chez les juments, il n'y a pas non plus d'effet sevrage, mais un effet jour marqué ($P < 0.001$, données comprises entre 6.98 ± 1.27 ng/ml (J-31) et 13.46 ± 4.56 ng/ml (J+95)).

Chez les juments, le sevrage augmente la longueur des télomères entre J-73 et J+95, et ce de manière plus importante pour le groupe P (+15.18%, $P = 0.01$) que pour le groupe B (+12.69%, $P = 0.05$). L'arrêt de la lactation plus précoce pour les juments du groupe « sevrage progressif » pourrait expliquer une diminution du stress chez les juments, entraînant une réactivation de la télomérase et ainsi une repousse des télomères.

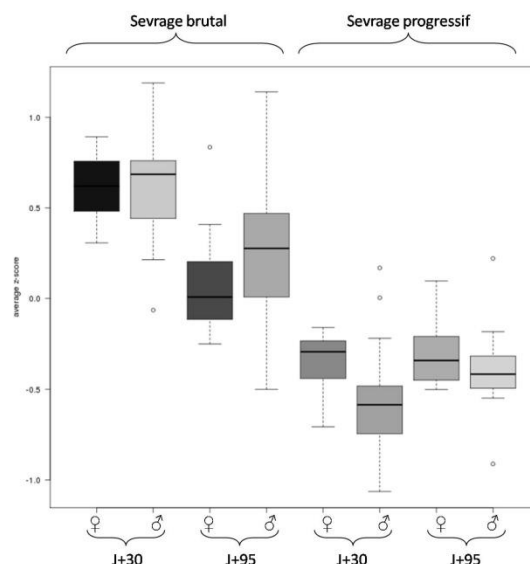


Chez les poulains, comme attendu, la longueur des télomères tend à diminuer avec l'âge (Groupe B : -7.28%, $P=0.56$ chez les mâles, -1.22%, $P=0.82$ chez les femelles – Groupe P : -3.88%, $P=0.30$ chez les mâles, -5.70%, $P=0.56$ chez les femelles). Même si on n'observe pas de modification significative de la longueur des télomères avant et après le sevrage, l'érosion des télomères semble moindre chez les poulains mâles soumis à un sevrage progressif, suggérant des effets bénéfiques de ce type de sevrage. Cependant l'inverse est observé chez les poulaches.

2.2 Expression des gènes

L'analyse transcriptomique permet d'identifier l'ensemble des gènes activés dans les cellules sanguines. Notre but est de rechercher les gènes différenciellement activés entre les 2 groupes expérimentaux à J+30 et J+95. L'analyse réalisée chez les juments 30 jours après le sevrage n'a montré aucune activation différentielle des gènes entre les 2 groupes P et B. Par conséquent, l'analyse à 95 jours n'a pas été faite. Chez les poulains, le type de sevrage a un effet sur l'activation différentielle des gènes 30 jours après le sevrage, mais cet effet n'est plus visible 95 jours après le sevrage (Figure II). L'analyse, par le logiciel oPOSSUM, des gènes différenciellement exprimés à J+30 indique que les gènes régulés par le facteur de transcription NR3C1 (récepteur du cortisol sécrété en situation de stress) ont tendance à être moins activés chez les poulains sevrés progressivement que chez ceux sevrés brutalement ($P=0.09$).

Figure II : Niveaux d'activation différentielle des gènes chez les poulains
Figure II: Differential activation levels of genes in foals



Conclusion

L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que le sevrage progressif a des effets bénéfiques chez les poulains à court terme, et qu'à plus long terme les poulains sevrés brutalement auraient compensé cet écart. Cependant, même s'il y a eu compensation 3 mois après le sevrage, il est possible que le type de sevrage influence le comportement du cheval à l'état adulte lorsqu'il est de nouveau soumis à un stress (effets épigénétiques). Il serait donc intéressant d'évaluer, chez les chevaux à l'âge adulte, l'impact du type de sevrage sur la réponse au stress notamment.

Références

Kwon, A.T., Arenillas, D.J., Worsley Hunt, R., Wasserman, W.W., 2012. oPOSSUM-3: advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or ChIP-Seq datasets. *G3*. 2012 Sep;2(9):987-1002. doi: 10.1534/g3.112.003202. Epub 2012 Sep 1.

Lansade, L., Lévy, F., Yvon, J.-M., Guettier, E., Reigner, F., Bouvet, G., Soulet, D., Vidament, M., 2016. Le sevrage : quelles sont les recommandations issues de la recherche équine ? 42^{ème} Journées de la Recherche Equine, 87-94.