



**Goudet Ghylène**

Ingénieur de Recherche à INRAE Centre Val de Loire, site de Nouzilly. Thèmes de recherche : reproduction équine, dosages salivaires, alternatives aux hormones en élevage, biodiversité faunistique.

[ghylene.goudet@inrae.fr](mailto:ghylene.goudet@inrae.fr)

## Dosage des hormones stéroïdiennes dans la salive de juments

Ghylène Goudet<sup>1</sup>, Cécile Douet<sup>1</sup>, Antoine Pianos<sup>2</sup>, Léna Haddad<sup>2</sup>, Amandine Gesbert<sup>3</sup>, Philippe Barrière<sup>3</sup>, Thierry Blard<sup>3</sup>, Anne-Lyse Lainé<sup>1</sup>, Stefan Deleuze<sup>4</sup>, Fabrice Reigner<sup>3</sup>, Philippe Liere<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRAE Centre Val de Loire, UMR PRC,

<sup>2</sup> INSERM Université Paris Saclay, U1195,

<sup>3</sup> INRAE Centre Val de Loire, UE PAO

<sup>4</sup> Université de Liège, département de clinique équine,

### Partenaire(s)



La science pour la santé  
From science to health



### Financeur(s)



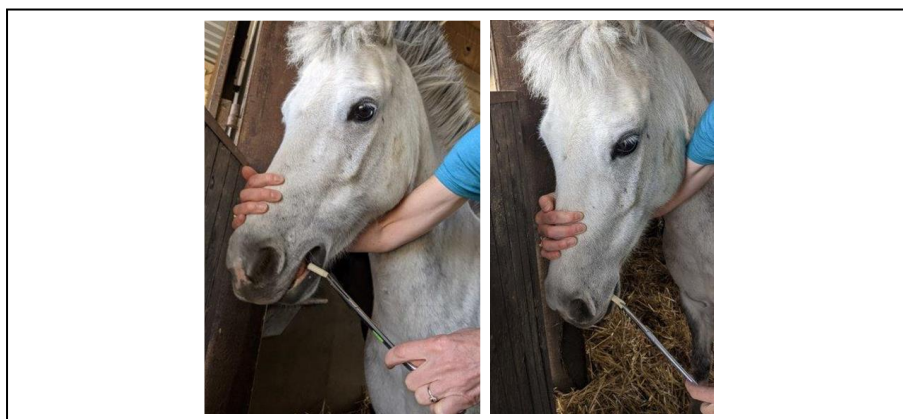
### Type de présentation : poster – projet de recherche

#### Ce qu'il faut retenir

La maîtrise de la reproduction dans la filière équine implique des actes douloureux, notamment au moment des prises de sang pour des dosages hormonaux permettant d'évaluer le stade physiologique d'une jument. Notre objectif est de développer un dosage des hormones stéroïdiennes dans la salive de juments afin de trouver une alternative aux prises de sang.

Nous avons quantifié 25 stéroïdes dans la salive de juments en anoestrus, en phase folliculaire, en phase lutéale et à 18 jours de gestation. Les concentrations salivaires de la prégnénolone, le précurseur de la progestérone, et de plusieurs dérivés de la progestérone, sont plus élevées chez les juments gestantes ou en phase lutéale que chez les juments en anoestrus ou en phase folliculaire. Ces stéroïdes pourraient donc être des biomarqueurs salivaires permettant de différencier les juments cycliques des juments gestantes et des juments en anoestrus.

Les concentrations élevées de prégnénolone dans la salive permettent d'envisager l'utilisation des kits ELISA de dosage salivaire disponibles dans le commerce et le développement d'un test salivaire de gestation ou de cyclicité applicable sur le terrain.



© prélèvement de salive sur une ponette à l'aide d'une salivette®

## 1 Contexte et objectifs

La prise en compte du bien-être animal est une demande de la société civile, qui est particulièrement sensible à la douleur infligée à l'animal d'élevage. La maîtrise de la reproduction dans la filière équine implique des actes douloureux, notamment au moment des prises de sang. En effet, les prises de sang réalisées pour des dosages hormonaux afin d'évaluer le stade physiologique d'une jument ou pour détecter un problème hormonal provoquent une douleur plus ou moins importante en fonction de l'animal et du manipulateur. De plus, tout acte douloureux réalisé par un humain compromet la relation humain-équiné et conduit à une perte de confiance du cheval vis-à-vis de l'humain, une réaction de retrait, voire une réaction défensive potentiellement dangereuse. Par ailleurs, sous la pression de la société civile, la réglementation pourrait évoluer vers une interdiction des actes douloureux en élevage. L'objectif de notre laboratoire est de limiter les actes douloureux dans le cadre de la reproduction, et notamment de trouver une alternative aux prises de sang. Les prélèvements de salive sont des actes non douloureux et non invasifs, qui peuvent être effectués sur le terrain. Ils sont utilisés fréquemment chez l'humain et se développent rapidement chez les mammifères domestiques (bovin, porc, etc.).

Nous avons récemment mis au point le dosage des hormones stéroïdiennes et de leurs précurseurs et métabolites dans la salive de jeunes truies. Ce dosage permet de quantifier une trentaine de stéroïdes dans 500µl de salive porcine [1,2,3]. L'objectif de ce travail est de doser les stéroïdes dans la salive de juments à différents stades du cycle et pendant la gestation, et de comparer les concentrations dans la salive aux concentrations dans le sang.

## 2 Méthode

Nous avons collecté la salive à l'aide d'une salivette® Sarstedt sur six juments de type Welsh à sept stades physiologiques successifs :

- En anoestrus,
- En phase folliculaire 3 jours, 2 jours, 1 jour avant l'ovulation et le jour de l'ovulation,
- En phase lutéale 6 jours après l'ovulation,
- En gestation 18 jours après l'ovulation.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés à l'aide de tubes héparines en même temps que les prélèvements de salive pour comparer les concentrations dans la salive et dans le plasma sanguin.

Les concentrations salivaires et plasmatiques des stéroïdes ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem, technique de référence en termes de sensibilité, spécificité et précision pour mesurer les stéroïdes dans un échantillon biologique.

## 3 Résultats

Nous avons quantifié 25 stéroïdes dans la salive équine et notamment :

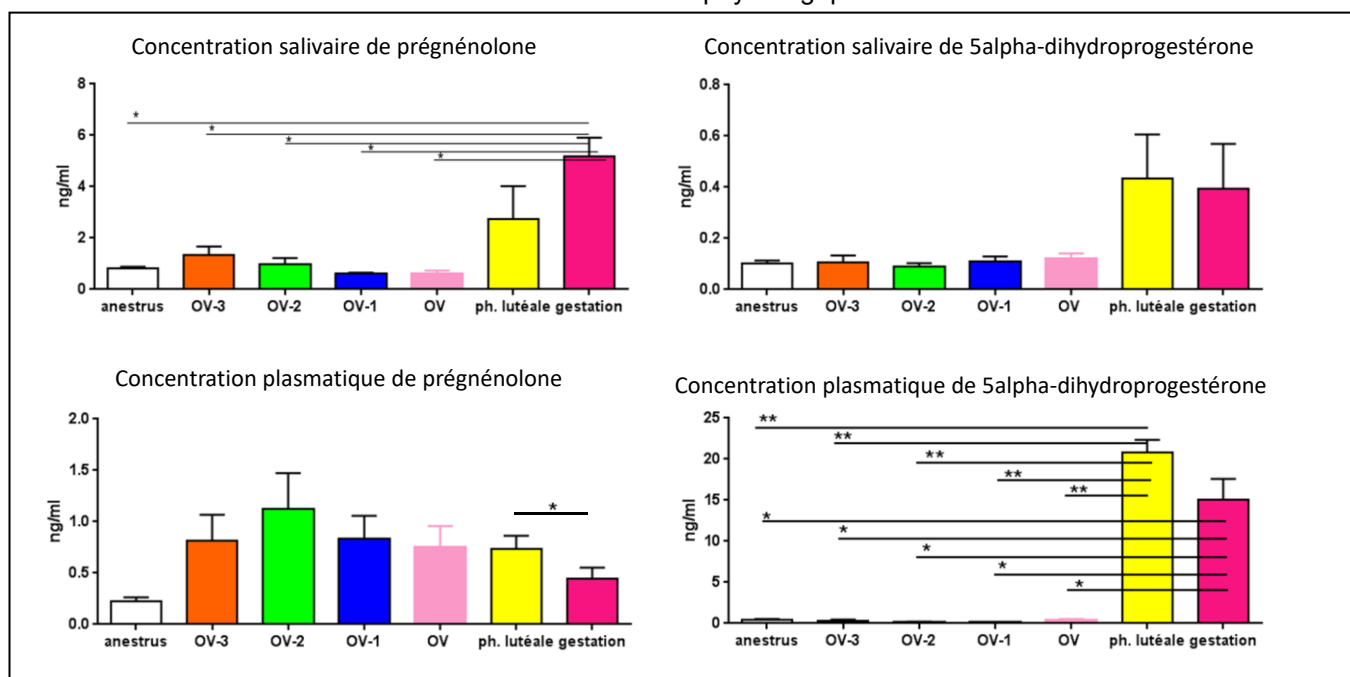
- La progestérone et ses dérivés (dihydroprogestérone, tetrahydroprogestérone, hexahydroprogestérone, hydroxyprogestérone),
- Les oestrogènes (oestrone, oestradiol-17beta, oestriol),
- Les androgènes (déhydroépiandrostérone, déhydroépiandrostérone sulfate, androsténediol),
- La prégnénolone et ses dérivés (dihydroprégnénolone, prégnénolone sulfate),
- La corticostérone et la cortisone.

Les concentrations salivaires de prégnénolone (Figure 1), le précurseur de la progestérone, sont significativement plus élevées chez les juments gestantes (4,9ng/ml) que chez les juments en anoestrus (0,8ng/ml ;  $p < 0,05$ ) ou en phase folliculaire (0,65 à 1,4ng/ml ;  $p < 0,05$ ) (figure ci-dessous). Elles tendent à être plus élevées en phase lutéale (2,4ng/ml) qu'en anoestrus ou en phase folliculaire. Les concentrations plasmatiques de prégnénolone ne présentent pas ces différences entre stades.

Les concentrations salivaires de 5alpha-dihydroprogestérone (Figure 1), le métabolite majeur de la progestérone, tendent à être plus élevées en phase lutéale (0,4ng/ml) et à 18 jours de gestation (0,38ng/ml) qu'en anoestrus (0,13ng/ml) ou en phase folliculaire (0,10 à 0,13ng/ml) (figure ci-dessous). Les concentrations plasmatiques de 5alpha-dihydroprogestérone présentent des variations similaires mais à des concentrations plus élevées (20ng/ml en phase lutéale et 14ng/ml pour les juments gestantes).

De plus, d'autres dérivés de la progestérone présentent des concentrations salivaires plus élevées en phase lutéale et en gestation qu'en anoestrus ou en phase folliculaire mais ces concentrations sont faibles ( $< 0,12$ ng/ml).

Figure 1 : Concentrations de prégnénolone et 5alpha-dihydroprogestérone dans la salive et le plasma de juments à différents stades physiologiques



OV-3 : phase folliculaire 3 jours avant l'ovulation ; OV-2 : phase folliculaire 2 jours avant l'ovulation ; OV-1 : phase folliculaire 1 jours avant l'ovulation ; OV : jour de l'ovulation ; ph. lutéale : phase lutéale 6 jours après l'ovulation ; gestation : jument gestante 18 jours après l'ovulation. \* : concentrations significativement différentes,  $p < 0,05$  ; \*\* : concentrations significativement différentes,  $p < 0,01$ .

Les concentrations de progestérone dans la salive sont faibles ( $< 0,04 \text{ ng/ml}$ ) et ne sont pas significativement différentes entre les 7 stades physiologiques, alors que les concentrations plasmatiques sont significativement plus élevées en phase lutéale ( $3,4 \text{ ng/ml}$  ;  $p < 0,001$ ) et en gestation ( $2,5 \text{ ng/ml}$  ;  $p < 0,05$ ), par rapport à l'anoestrus ( $0,04 \text{ ng/ml}$ ) et à la phase folliculaire ( $0,1$  à  $0,2 \text{ ng/ml}$ ). Les concentrations salivaires de progestérone ne reflètent donc pas les variations des concentrations plasmatiques.

Les concentrations des oestrogènes dans la salive sont faibles ( $< 0,015 \text{ ng/ml}$ ) et ne varient pas en fonction du stade physiologique, alors que les concentrations plasmatiques sont significativement plus élevées en phase folliculaire ( $0,02$  à  $0,04 \text{ ng/ml}$  pour l'oestrone par exemple ;  $p < 0,05$ ) qu'en anoestrus ( $0,007 \text{ ng/ml}$ ), en phase lutéale ( $0,008 \text{ ng/ml}$ ) ou en gestation ( $0,004 \text{ ng/ml}$ ). Les concentrations salivaires des oestrogènes ne reflètent donc pas les variations des concentrations plasmatiques.

#### 4 Conclusions et applications pratiques

En conclusion, les concentrations dans la salive de la prégnénolone, précurseur de la progestérone, et de plusieurs métabolites de la progestérone sont plus élevées en phase lutéale et à 18 jours de gestation par rapport à la phase d'anoestrus et à la phase folliculaire. Ces stéroïdes pourraient donc être des biomarqueurs salivaires permettant de différencier les juments cycliques, des juments gestantes et des juments en anoestrus. Une étude complémentaire sur un plus grand nombre de juments permettra de confirmer ces résultats.

De plus, les concentrations de la prégnénolone dans la salive sont supérieures à la limite de détection des kits ELISA de dosage salivaire disponibles dans le commerce, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces kits commerciaux pour le dosage de la prégnénolone dans la salive équine. L'utilisation de kits de dosage commerciaux permettra de développer à court terme un test salivaire de gestation ou de cyclicité applicable sur le terrain.

Le développement d'un test salivaire pour les diagnostics de gestation ou de cyclicité permettra de remplacer les prises de sang par des prélèvements de salive non douloureux et réalisables par l'éleveur. Limiter les actes douloureux en élevage contribuera à éviter les réactions défensives des animaux qui sont potentiellement dangereuses, à mieux prendre en compte le bien-être animal et à promouvoir un élevage plus éthique.

#### 5 Pour en savoir plus

[1] Ghylène Goudet, Armelle Prunier, Lydie Nadal-Desbarats, Doryan Grivault, Stéphane Ferchaud, Antoine Pianos, Léna Haddad, Frédéric Montigny, Cécile Douet, Jonathan Savoie, Florence Maupertuis, Antoine Roinsard, Sylviane Boulot, Philippe Liere, 2021. Steroidome and metabolome analysis in gilt saliva to identify potential biomarkers of boar effect receptivity. *Animal* 15, 100095. doi: 10.1016/j.animal.2020.100095

[2] Ghylène Goudet, Philippe Liere, Antoine Pianos, Neiké Fernandez, Annie Cambourg, Jonathan Savoie, Christophe Staub, Eric Venturi, Cécile Douet, Stéphane Ferchaud, Florence Maupertuis, Antoine Roinsard, Sylviane Boulot, Armelle Prunier, 2019. Evolution of steroid concentrations in saliva from immature to pubertal gilts for the identification of biomarkers of gilts receptivity to boar effect. *Livestock Science* 228, 5-17. doi: 10.1016/j.livsci.2019.07.018.

[3] Ghylène Goudet, Philippe Liere, Doryan Grivault, Cécile Douet, Jonathan Savoie, Stéphane Ferchaud, Florence Maupertuis, Antoine Roinsard, Sylviane Boulot, Armelle Prunier. Analyse des stéroïdes dans la salive de cochettes pour identifier des biomarqueurs de la période de réceptivité à l'effet mâle. 51èmes Journées de la Recherche Porcine, 5-6 février 2019, Paris, France, 43-44.

Ghylène Goudet, Philippe Lière, Cécile Douet, Jonathan Savoie, Stéphane Ferchaud, Florence Maupertuis, Antoine Roinsard, Sylviane Boulot, Armelle Prunier. Recherche de biomarqueurs salivaires de la période de réceptivité à l'effet mâle chez la cochette. 50èmes Journées de la Recherche Porcine, 6-7 février 2018, Paris, France.

Ghylène Goudet, Philippe Lière, Cécile Douet, Jonathan Savoie, Christophe Staub, Eric Venturi, Stéphane Ferchaud, Sylviane Boulot, Armelle Prunier. Mesure des concentrations en stéroïdes dans la salive de cochettes immatures, pré-pubères et pubères. 49èmes Journées de la Recherche Porcine, 31 janvier – 1er février 2017, Paris, France.