

# Identification de marqueurs précoces de la gestation chez la brebis.

## Identification of early pregnancy related factors in ewes.

MAUFFRE V. (1), SANDRA O. (2), INGHELS S. (1), SILVA L. (1), GIRAUD-DELVILLE C. (2), LOUP B. (2), JOUANEU L. (2), CAPO D. (4), URIEN C. (3), SCHWARTZ I. (3), GRIMARD B. (1), CONSTANT F. (1)  
 (1) ENVA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-94704 Maisons-Alfort, France  
 (2) INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France  
 (3) INRA, UR 0892 Virologie et Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, France  
 (4) INRA, UE 1298 Unité Commune d'Expérimentation Animale de Bressonvilliers, Leudeville, France

### INTRODUCTION

Chez la vache, le diagnostic de gestation par échographie transrectale ou par dosage des PAG (*Pregnancy Associated Glycoproteins*), ne peut s'établir avec certitude avant 30 jours, soit au-delà de la durée physiologique d'un cycle (21 jours pour la vache, 17 jours pour la brebis). En l'absence de gestation, cela conduit à la perte d'un cycle pour l'animal, entraînant ainsi un allongement de l'intervalle vêlage – insémination fécondante, et par conséquent un allongement des périodes improductives associé à une diminution de la rentabilité des exploitations.

Dans ce contexte, la mise au point d'un diagnostic de gestation précoce et fiable (réalisable avant le retour en chaleurs de l'animal) constituerait une avancée significative. L'objectif principal de cette étude est l'identification de marqueurs précoces de la gestation à partir des cellules circulantes des ruminants.

### 1. MATERIEL ET METHODES

Afin d'identifier des marqueurs précoces de la gestation, une analyse transcriptomique a été réalisée sur les leucocytes ovins circulants issus de sang périphérique prélevé à la veine jugulaire et isolés par gradient de Percoll (4 brebis gravides et 4 non gravides), 15 jours après IA. Les brebis ont été euthanasiées le jour de la prise de sang et la gestation a été constatée par la présence d'embryons au stade de développement attendu. Une liste de Gènes Différentiellement Exprimés (GDE) entre les leucocytes isolés de brebis gravides et non gravides a été établie. Trois gènes (*PBEF1*, *PLAC8*, *MARPG1*\*) ont été sélectionnés parmi les GDE dont le différentiel d'expression était le plus marqué entre les deux conditions physiologiques. Le niveau d'expression des transcrits codés par ces gènes a été confirmé par RT-qPCR sur les leucocytes circulants prélevés à partir de 28 brebis (8 gravides et 20 non gravides), multipares (parité  $\geq 3$ ), 15 jours après IA.

A partir des niveaux d'expression des transcrits, une courbe de ROC (*receiver operating characteristic*) a été construite pour chacun des trois gènes, afin d'identifier une valeur-seuil d'expression, correspondant à la valeur maximale de l'indice de Youden (Delacour *et al.*, 2005) et permettant de discriminer les brebis gravides des brebis non gravides. A partir de cette valeur-seuil, un test correspondant à chaque gène a été réalisé dont les valeurs de performance sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Performance des 3 tests diagnostiques

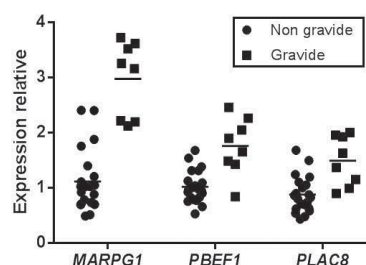
Gène	Se	Sp	VPP	VPN	Yd	a
<i>MARPG1</i>	100%	90%	80%	100%	0,90	0,96
<i>PBEF1</i>	88%	90%	78%	95%	0,78	0,88
<i>PLAC8</i>	100%	67%	53%	100%	0,67	0,89

Se : Sensibilité ; Sp : Spécificité ; VPP : Valeur prédictive positive ; VPN : Valeur prédictive négative ; Yd : Indice de Youden ; a : Aire sous la courbe

### 2. RESULTATS

L'analyse transcriptomique a permis d'identifier 116 GDE ( $p < 0,05$ ) entre les leucocytes isolés de brebis gravides *versus* non gravides. Parmi ces 116 gènes, 75 gènes sont

surexprimés chez les animaux gravides et 41 gènes sous-exprimés. Les niveaux d'expression de 3 gènes d'intérêt (*MARPG1*, *PBEF1* et *PLAC8*, surexprimés chez les brebis gravides) ont été évalués par RT-qPCR et sont présentés dans la figure 1. Les performances des 3 tests diagnostiques sont reprises dans le tableau 1. L'étude de l'aire sous la courbe de ROC (a) permet d'évaluer l'intérêt diagnostic d'un test (Swets, 1988). Si les tests *PBEF1* et *PLAC8* sont d'apport moyennement informatif ( $0,7 \leq a < 0,9$ ), le test *MARPG1* est quant à lui un test très informatif ( $0,9 \leq a < 1$ ) et permet de diagnostiquer la gestation avec une sensibilité et une VPN de 100%.



**Figure 1** : Représentation graphique des résultats de RT-qPCR pour les gènes *MARPG1*, *PBEF1* et *PLAC8*.

### 3. DISCUSSION

Dans une étude réalisée chez des vaches Prim'Holstein (Green *et al.*, 2010), les auteurs ont montré que les niveaux de transcrits de *OAS1* dans le sang circulant permettaient de diagnostiquer avec précision la gestation (Se = 100%, Sp = 100%) chez la génisse mais que le niveau de fiabilité du test diminuait à mesure que la parité augmentait (Se < 70%, Sp < 70%, pour une parité supérieure à 2). Dans notre étude, l'utilisation du niveau d'expression de *MARPG1* permet d'identifier avec certitude (VPN = 100%) 9 animaux non gravides sur 10 (Sp = 90%), avec une parité  $\geq 3$ . L'échantillon sur lequel ont été calculés les critères de performance de ce test étant limité (n = 28) et concernant des ovins, une confirmation de ces résultats préliminaires avec un effectif bovin plus conséquent est nécessaire.

### CONCLUSION

Cette étude constitue une première étape encourageante dans le développement d'un diagnostic très précoce, non invasif (prise de sang) de la gestation. Ces données doivent maintenant être validées à plus large échelle sur une population bovine, espèce pour laquelle le développement d'un tel test constituerait une réelle avancée significative en termes de diagnostic de gestation.

Delacour H., Servonnet A., Perrot A., Vigezzi J.F., Ramirez J.M., 2005. Ann. Biol. Clin., 63(2), 145-154

Green J.C., Okamura C.S., Poock S.E., Lucy M.C., 2010. Anim. Reprod. Sci., 121, 24-33

Swets J.A., 1988. Science, 240, 1285-1293

\* pour des raisons de confidentialité, le nom de ce gène a été modifié