

Effet d'une supplémentation en vitamine B12 et en acide folique sur la reproduction du bovin laitier, une analyse génomique des cellules de la granulosa

FRANÇOIS J. RICHARD¹, ANNIE GAGNON¹, CHRISTIANE L. GIRARD², MARC-ANDRÉ SIRARD¹, JEAN-PAUL LAFOREST¹

¹Centre de recherche en biologie de la reproduction, Département des sciences animales, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, G1V 0A6

²Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de Recherche et Développement sur le Bovin Laitier et le Porc, Sherbrooke, Québec, J1M 1Z3, Canada.

Francois.Richard@fsaa.ulaval.ca

Mots clés : Bovin laitier, vitamine B12, acide folique, granulosa, génomique

Introduction : La reproduction des vaches en début de lactation demeure encore aujourd'hui un défi important. Au cours de cette période la production laitière de l'animal est telle que l'animal se retrouve en déficit énergétique. Une étude récente rapporte qu'une supplémentation en vitamine B12 et acide folique auraient des bénéfices sur la production laitière (tels que le volume de lait produit, le lactose et les protéines) (Preynat et al., 2009). Cette dernière étude a démontré une amélioration de l'efficacité du métabolisme énergétique par le supplément vitaminique. Nous avons donc voulu investiguer l'effet d'une telle supplémentation sur la reproduction. Pour ce faire, nous avons concentré notre étude sur l'ovaire. Plus précisément, nous avons étudié la génomique fonctionnelle des cellules de la granulosa du follicule dominant. Notre hypothèse étant que les animaux ayant reçu une supplémentation en acide folique et en vitamine B12 auraient une meilleure fonction reproductive que les animaux non traités.

Méthodologie : Cette étude a été approuvée par le comité des bons soins des animaux de l'Université Laval et a été réalisée au CRESAD de Deschambault. Douze paires d'animaux ont été choisis selon leur parité (deux parités et plus), leur production laitière et le décompte de cellules somatiques ainsi que leur date de vêlage. Les animaux ont été alimentés selon une diète pré-vêlage au cours des trois semaines précédant le vêlage suivi d'une diète de lactation jusqu'à la fin de l'expérience. Une analyse hebdomadaire des composantes de la ration a permis de réajuster constamment les apports nutritionnels afin de les conserver stables tout au long du projet.

Les animaux ont reçu des injections intramusculaires hebdomadaires de 320 mg d'acide folique et de 10 mg de vitamine B12 tandis que les animaux contrôles recevaient une solution saline. Les injections ont débuté trois semaines pré-vêlage jusqu'à 9 semaines post-vêlage.

La phase œstrale des animaux a été synchronisée au jour 57 ± 3 post-vêlage. Les animaux ont reçu deux injections de PGF2 α à 14 jours d'intervalle. Le développement du follicule dominant a été suivi par échographie transvaginale à partir du jour 40 ± 3 . Approximativement 66 h suivant la dernière injection de PGF2 α la population de cellules de la granulosa provenant du follicule dominant a été récoltée par ponction transvaginale échoguidée. Les follicules ayant un diamètre supérieur à 12 mm ont été récoltés. Les cellules de la granulosa ont été séparées de la liqueur folliculaire par centrifugation. Par la suite, les cellules ont été congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

L'ARN des cellules de la granulosa a été extrait et purifié avec le kit d'Arcturus PicoPure RNA isolation kit incluant un traitement à la DNase sur les colonnes de purification. La qualité et la quantité d'ARN ont été évaluées en microfluidique. Seulement les échantillons recevant une note supérieure à 7 (RIN) furent sélectionnés. L'ARN des échantillons a été amplifié par deux rondes du kit T7 RNA amplification kit RiboAmp HSplus. Les ARN antisens furent par la suite marqués avec les fluorochromes Cy3 et Cy5 avec le ULS Fluorescent labeling kit. Après purification, les échantillons furent hybridés sur la biopuce bovine d'EmbryoGENE. Après différents lavages, la lecture de la biopuce a permis l'identification des gènes différentiellement exprimés.

Une analyse statistique a été réalisée par FlexArray avec un niveau de sélection où le $p < 0.05$ et un ratio plus grand que 2. L'étude des voies génétiques issues des traitements a été possible grâce à Ingenuity Pathway Analysis. Cette analyse a permis de choisir une liste de gènes à valider. Cette dernière a été réalisée par PCR quantitatif.

Résultats : Les concentrations plasmatiques de vitamine B12 et d'acide folique sont significativement plus grandes chez les animaux traités comparativement aux animaux contrôles. Les concentrations plasmatiques de progestérone démontrent que la synchronisation oestrale s'est bien produite. À la récolte des cellules de la granulosa les volumes de liquide folliculaire étaient une fois et demie plus grands chez les follicules des vaches traitées que les vaches contrôles supportant un diamètre folliculaire plus grand. L'analyse de la régulation de l'expression génique selon les traitements met en évidence une augmentation de l'expression des gènes associés à la stéroïdogénèse, la différenciation cellulaire induite par l'hormone lutéinisante (LH), la synthèse des prostaglandines et l'ovulation par opposition à une diminution de l'expression des gènes associés au cycle cellulaire (Fig. 1). Après validation par PCR quantitatif, ces résultats suggèrent que les cellules de la granulosa des vaches traitées ont une maturation pré-ovulatoire précoce, et qu'elles sont en train de répondre à un effet de type LH.

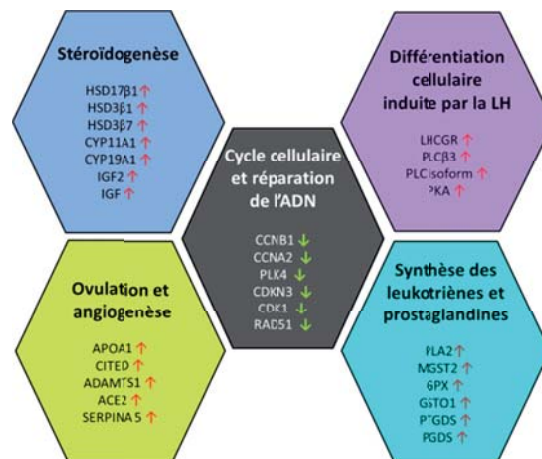


Figure 1 : Représentation schématique de l'analyse des gènes différentiellement exprimés chez les animaux traités par rapport aux animaux contrôles. Les gènes ont été classés par fonctions biologiques observables chez l'ovaire. En résumé, pour la stéroïdogénèse on retrouve des déshydrogénases, l'aromatase, des facteurs de croissance insulinaire ainsi que la « side chain cleavage ». Pour le cycle cellulaire, il y a des cyclines, polo-like kinase et des cyclin-dépendant kinase. Pour la différenciation cellulaire, on retrouve le récepteur à la LH tandis que pour l'ovulation on observe une apolipoprotéine, un transactivateur et une métalloprotéinase tous bien connus pour être régulés au moment de l'ovulation.

Conclusion : Le traitement des vaches par des injections intramusculaires hebdomadaires de vitamine B12 et d'acide folique affecte la physiologie ovarienne. L'analyse de l'effet des vitamines du complexe B montre une maturation pré-ovulatoire plus hâtive que chez les animaux contrôles. Cette exposition entraîne une différenciation cellulaire amenant le follicule à changer sa stéroïdogénèse et à se préparer à l'ovulation. Par contre, nous ne pouvons pour l'instant nous prononcer sur le mécanisme d'action des vitamines bien que certaines options demeurent à l'étude.

Références :

Preynat A, Lapierre H, Thivierge MC, Palin MF, Matte JJ, Desrochers A, Girard CL. Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. 2009. J Dairy Sci 92, 677-689.