

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'ALGER

Magister

En Médecine Vétérinaire

Option : Nutrition et Reproduction des Bovins

Thème

**Dosage de la glycoprotéine associée à la gestation
(PAG) par la technique enzymo-immunologique
(ELISA) durant le premier trimestre de la
gestation chez la vache**

Préparé par : YAHI Krimou

Membres du jury :

Présidente : Mme TEMIM-KESSACI S	Professeur (ENSV Alger)
Examineurs : Mr IGUER-OUADA M	Professeur (Université de Bejaia)
Mr BENBAREK H	Professeur (Université de Mascara)
Mr LAMARA A	Maitre de Conférences A (ENSV Alger)

Promoteur: Mr **AYAD Abdelhanine** Maitre de Conférences A (Université de Bejaia)

Année 2012-2013

Résumé

L'objectif de cette étude était la validation d'une technique immuno-enzymologique (ELISA) et le dosage de PAG pour le diagnostic précoce de la gestation chez la vache. Au total 120 prélèvements ont été effectués à partir des veines coccygiennes des bovins de races différentes. 52 échantillons constituent le groupe des femelles non gestantes, et 68 échantillons issus de femelles (25-50 J post-IA) confirmées gestantes par échographie ou palpation transrectale. Les concentrations sériques de PAG ont été déterminées par la technique ELISA sandwich directe (EIA PAG (E.G.7), CER Groupe). Les coefficients de variations (CV) intra- et inter-assay obtenus étaient respectivement 2,4-2,71 %, et 6,01-12,8%. Les dilutions sérielles étaient parallèles ($R^2=0,98$). Les résultats du test de récupération étaient très satisfaisant (94,8-99,6 %). Quant à la spécificité, aucune réaction croisée n'a été enregistrée à l'égard des molécules testées. Les concentrations moyennes de PAG des femelles gestantes et non gestantes étaient respectivement $3,5 \pm 1,17$ ng/ml et $0,77 \pm 0,48$ ng/ml. Les résultats de sensibilité et valeurs prédictives négatives (VPN) de la technique immuno-enzymologique étaient de 100%. Par contre, la spécificité, les valeurs prédictives positives (VPP) ont enregistrées respectivement des valeurs 71,2 % et 81,9 %. Le pourcentage d'exactitude obtenu était satisfaisant (87,5%). A terme de cette expérimentation, nos résultats montrent clairement que le dosage de PAG sérique par la technique immuno-enzymologique pourrait être utilisé dans le diagnostic précoce de gestation chez la vache.

Mots clefs : Diagnostic, gestation, vache, PAG, ELISA.

Summary

The aim of this study was to validate a pregnancy-associated glycoprotein enzyme-immunoassay method for early pregnancy diagnosis in cows. Blood samples were collected in the coccygeal vein in females non-pregnant (n=52) and pregnant (n=68) between 25 to 50 days post-IA, diagnosed pregnant by ultrasonography or rectal palpation). Concentrations of PAG were assessed by spectrophotometer using direct ELISA sandwich (EIA PAG (E.G.7), CER Groupe). The intra- and inter-assay CV obtained were 2.4-2.71 % and 6.01-12.8 %, respectively. The results of accuracy (94.8-99.6%) and parallelism ($R^2=0.98$) were very satisfactory. Concerning the specificity, no cross-reaction was observed with different molecules tested. The PAG-ELISA method gave 100% sensitivity and negative predictive value (NPV). The Specificity and positive predictive value (PPV) were 71.2% and 81.9%,

respectively. The mean PAG concentration in females non-pregnant was very lower (0.77 ± 0.48 ng/ml). For samples from pregnant females, the mean PAG concentration was higher (3.5 ± 1.17 ng/ml) than the threshold 0.8 ng/ml. The rate of accuracy obtained was satisfactory (87.5%). In conclusion, these results show clearly that PAG enzyme-immunoassay technique can be used to measure PAG in serum bovine for early pregnancy diagnosis in cows.

Key words: diagnosis, pregnancy, cow, PAG, ELISA.

ملخص

إن الهدف من هذه الدراسة هو إثبات فعالية تركيبة جديدة PAG-ELISA للتشخيص المبكر للحمل عند البقرة ، و لهذا استعملنا 120 عينة من دم الوريد لأبقار من مختلف الأنواع حيث 52 منها تمثل مجموعة الإناث الغير الملقحة و 68 تمثل مجموعة الإناث الملقحة (بين 25 إلي 50 يوم بعد التلقيح) و التي تأكدنا من حملهن لاحقا بواسطة الموجات فوق الصوتية (Echographie) أو بطريقة الجس عبر الشرج. التراكيز المصلية للكليكوبروتينات المتصلة بالحمل (PAG) استنتجت بواسطة ELISA sandwich الغير المباشرة (E.G.7) CER Groupe (EISA PAG). مقادير معاملات الاختلاف الداخلي و الخارجي هي علي التوالي 2,4 – 2,71 % و 6,01 - 12,8 % . منحنيات المحاليل التسلسلية متوازية ($R^2=0.98$). نتائج فحص الاسترجاع جد مرضية (94.8 - 99.6 %). و بالنسبة لخصوصية التركيبة ، لم نلاحظ أي تفاعل يذكر مع كل المواد التي استعملناها. متوسط تركيز الكليكوبروتينات المتصلة بالحمل (PAG) لمجموعة الإناث الملقحة و الغير الملقحة هي علي التوالي : 1.17 ± 3.5 نغ/مل و 0.77 ± 0.48 نغ/مل. أظهرت هذه الدراسة نسبة 100 % من قسمة حساسية التركيبة و القيم المحتملة السلبية. بينما نسب الخصوصية و القيم المحتملة الموجبة هي علي التوالي : 71.2 % و 81.9 % . في حين جاءت نسبة الدقة مرضية 87.5 % . من جراء هذه التجربة يمكن القول أن هذه النتائج تظهر بوضوح أن معايرة الكليكوبروتينات المتصلة بالحمل (PAG) بطريقة ELISA يمكن استعمالها للتشخيص المبكر للحمل .

DEDICACES

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL

- ❖ A mes très chers parents.
- ❖ A ma chère femme et à ma petite fille SARA.
- ❖ A mes frères et ma sœur.
- ❖ A ma belle famille.

JE LE DÉDIE ÉGALEMENT À LA MÉMOIRE DE TROIS DÉFUNTS QUI M'ONT ÉTÉ TOUJOURS TRÈS CHERS

- Au Docteur Vétérinaire SADI Saïd (*Fils de mon grand-père*),
décidé à l'âge de 27 ans.
- A mes grand-mères paternelle et maternelle.

Que le BON DIEU, le tout clément et le plus miséricordieux, les
accueille dans son vaste paradis.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Vétérinaire TOUAZI Leg-hel, qui je le considère non seulement un ami ou un confrère mais aussi, un frère hors paire. Je le remercie avec toute sincérité car il m'a prouvé à maintes reprises que l'être humain peut finalement être un ange sur terre. Je ne peux être que reconnaissant pour ces précieux conseils et son soutien inconditionnel.

Mais encore, je me sens davantage redevable envers ce gentleman car c'est par son intermédiaire que j'ai eu l'honneur de connaître le Professeur IGUER-OUADA Mokrane. Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à ce professeur qui n'a jamais cessé de m'encourager à poursuivre mes études. Il a su nous faire partager son enthousiasme pour la recherche dans le domaine de la reproduction. Son raisonnement scientifique et ces qualités humaines font de lui un modèle qui mérite d'être suivi. C'est grâce à son aide technique et matériel qu'on a pu réaliser ce modeste travail. Je le remercie énormément d'avoir accepté d'être parmi les membres de jury.

Je voudrais également remercier vivement Mr AYAD Abdelhanine pour m'avoir accordé sa confiance et m'avoir guidé par ces réflexions scientifiques tout au long de ce travail. Que cette thèse soit le témoignage de toute ma gratitude pour ses précieux conseils. Je souhaite vivement d'avoir une autre chance de travailler ensemble.

Je remercie le Professeur S. TEMIM-KESSACI de m'avoir fait l'honneur d'être la présidente du jury de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur BENBAREK et au Dr LAMARA d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Je remercie le directeur de l'EPSP d'Azeffoun ainsi que le personnel de son laboratoire en particulier le chef de service Monsieur IFETISSENE Mourad.

Je remercie également le directeur de l'hôpital KHELIL Amrane de la wilaya de Bejaia ainsi que son personnel détaché au centre de transfusion sanguine, en particulier Monsieur CHERGUI Hamid.

Je remercie amplement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Je pense en particuliers à : ASKRI Amar, SADOUDI Ahmed, MOULA Nassim, BAALI Saïd, BELHARAT Arezki, DJABELLAH D, LATRECHE Abdelhalim, SAIDANI Khellaf, KADDOUR Abdenour, AKKOU Madjid, SADI Madjid, HAMMOUNI Rabah, BOUDJELABA Sofiane, YAHIAOUI M'hana et YAHYI Mohamed.

Je remercie également tous les enseignants qui m'ont beaucoup encouragé : Mr SOUAMES, Mr HAMDY et Mr AZZI Noureddine.

Je ne me permis jamais d'être ingrat à l'égard des éleveurs qui m'ont accueilli dans leurs élevages pour la réalisation des prélèvements sanguins.

Mes sincères reconnaissances à tous

Table des matières

-	Introduction.....	1
---	-------------------	---

A- Partie bibliographique

I-	L'endocrinologie de la gestation et le développement embryonnaire.....	2
	I-1. La fécondation et la vie libre de l'embryon.....	2
	I-2. L'implantation.....	3
	I-3. Le placenta.....	3
	I-4. Les cellules binucléées.....	5
	I-5. Les protéines associées à (ou spécifiques de) la gestation.....	6
	I-5-1. Historique et taxonomie.....	6
	I-5-2. Caractéristiques biologiques.....	7
	I-5-3. Rôles des PAGs.....	10
	I-5-4. Les applications cliniques des PAGs.....	11
II-	La technique ELISA.....	14
	II-1. ELISA direct (sandwich).....	15
	II-2. ELISA indirect.....	16
	II-3. ELISA par compétition.....	17

B- partie expérimentale

I-	Matériels et méthodes.....	18
	I-1. Cadre expérimental.....	18
	I-2. Animaux et prélèvements.....	18
	I-3. Dosage des prélèvements.....	19
	I-4. Validation de la technique de dosage.....	22
	I-5. Validation de la méthode de diagnostic.....	23
	I-6. Analyse statistique.....	24
II-	Résultats	25
	II-1. Paramètres de la validation technique.....	25
	II-2. Paramètres de la validation diagnostique.....	29
	II-3. Les concentrations de PAG obtenues des différents groupes.....	30
	IV-4. Comparaison des concentrations en PAG des génisses par rapport aux vaches.....	32
III-	Discussion.....	33
IV-	Conclusion.....	38
	 Références bibliographiques.....	 40

Liste des abréviations

AFP : alphafoetoprotéine

bCG : bovine chorionique gonadotrophine

BCS: body condition score

bPAG: bovine pregnancy-associated glycoprotein

CG: chorionique gonadotrophine

CV: coefficient de variation

DAS: double antibody sandwich

DG : diagnostic de gestation

DS: deviation standard

eCG: équine chorionique gonadotrophine

EIA: enzyme immune-assay

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FIV: fécondation invitro

FSH: follicule stimulating hormone

GnRH: gonadotropine releasing hormone

hCG: humain chorionique gonadotrophine

HRP: horseradish peroxidase

IA: insémination artificielle

J: jour

KDa: kilo Dalton

LH: luteinizing hormone

ml: millilitre

ng: nanogramme

nm: nanomètre

PAG: pregnancy-associated glycoprotein

PGE2: prostaglandine E2

PGF2 α : prostaglandine F2 α

PL: l'hormone lactogène placentaire

PMSG: pregnant-mare seru-gonadotrophin

Pr : précision

PSP-60 : protéine spécifique de la gestation 60

PSPA : protéine spécifique de la gestation A

PSPB : protéine spécifique de la gestation B

R² : coefficient de détermination

RIA : radio-immunoassay

SAS : statistical analysis system

Se : sensibilité

Sp : spécificité

SUB-3 : antigène spécifique des cellules binucléées de l'utérus gravide

VPN : valeur prédictives négatives

VPP : valeurs prédictives positives

μ l : microlitre

Liste des figures

Figure 1 : représentation schématique de la migration des cellules binucléées chez la vache.

Figure 2 : représentation d'une plaque ELISA de 96 puits prête à la lecture.

Figure 3 : schéma de la réaction antigène-anticorps de l'ELISA sandwich.

Figure 4 : représentation schématique des réactions de sandwich direct et sandwich indirect.

Figure 5 : carte géographique illustrant les wilayas dont les prélèvements ont été effectués (Bejaia, Biskra et Tizi-Ouzou).

Figure 6 : photo présentant les éléments composant le kit (la plaque à 96 puits, les solutions standards, les réactifs, la solution de rinçage et le tampon de dilution).

Figure 7 : illustration schématique du principe du kit ELISA (sandwich direct) utilisé dans cette partie pratique.

Figure 8 : courbe de régression résultante des concentrations standards en fonctions de leurs absorbances moyennes correspondantes.

Figure 9: comparaison des concentrations standards données (en bleu) avec leurs concentrations correspondantes calculées (en rouge).

Figure 10 : représentation des concentrations en PAG correspondantes aux dilutions sérielles de l'échantillon N° 1 utilisé dans le test de parallélisme.

Figure 11 : représentation des concentrations en PAG correspondantes aux dilutions sérielles de l'échantillon N° 2 utilisé dans le test de parallélisme.

Figure 12 : représentation des valeurs de PAG de cinq échantillons conservés chacun à des températures différentes (-20° C, 37° C et à la température ambiante qui avoisine 24° C).

Figure 13 : représentation des concentrations de PAG mesurées chez la vache N° 36.

Liste des tableaux

Tableau 1 : le mode d'expression spatiale des bPAGs.

Tableau 2 : les étapes de réalisation de l'ELISA indirect.

Tableau 3 : différents cas possibles selon les résultats du diagnostic de gestation.

Tableau 4 : les valeurs des coefficients de variations intra et inter-assay.

Tableau 5 : les taux de récupération de PAG par le kit PAG-ELISA.

Tableau 6 : les concentrations en PAG obtenues pour le test de spécificité à l'égard des différentes dilutions des molécules utilisées.

Tableau 7 : répartition des 120 prélèvements en 04 groupes (vrais positifs: A, faux positifs: B, vrais négatifs: C et les faux négatifs: D).

Tableau 8 : Valeurs des paramètres de validation diagnostique du kit ELISA – PAG.

Tableau 9: classement des sérums de groupe 2 selon la période de prélèvement.

Tableau 10: concentrations en PAG des femelles du groupe 2 (n=68) en fonction de leur parité et le jour moyen de prélèvement.

Introduction

Les impératifs économiques des élevages bovins obligent de plus en plus les éleveurs à optimiser le potentiel de reproduction de leurs troupeaux moyennant notamment une réduction de l'intervalle entre vêlages. L'atteinte de cet objectif prioritaire repose sur l'insémination des vaches dans les 90 jours post-partum aussi tôt que l'involution utérine est achevée. Dès lors, il convient désormais d'identifier le plus précocement possible les femelles non gestantes afin de les ré-inséminer de nouveau. Pour cela, le diagnostic de gestation revêt une importance cruciale et constitue une activité fréquente des praticiens vétérinaires impliqués dans l'approche d'optimisation des productions et le suivi de reproduction. En effet, différentes méthodes de diagnostic de gestation ont été mises au point chez les bovins dont les principales sont les méthodes de laboratoire et les méthodes cliniques. En Algérie, hormis la méthode la plus classique basée sur l'observation ou non du retour en chaleur, la méthode la plus couramment utilisée est la palpation transrectale appliquée généralement à partir de 90 jours post-insémination. Ces dernières années, une frange de vétérinaires a pris l'initiative de révolutionner le domaine de la reproduction en utilisant l'échographe pour le diagnostic de gestation. A l'exception des méthodes purement cliniques, aucune méthode de laboratoire n'a été déjà appliquée sur le terrain. Dans le but d'apporter des alternatives meilleures et d'enrichir davantage les moyens utiles pour le diagnostic de gestation chez les femelles bovines, nous avons fixé un objectif de valider un nouveau kit basé sur le dosage sérologique des glycoprotéines associées à la gestation (PAG) par une technique immuno-enzymatique (ELISA).

En effet, nous avons suivi une approche qui consiste à récolter des prélèvements de sang à partir de deux lots d'animaux distincts : lot de femelle non inséminées (groupe contrôle) et un lot des femelles prélevées entre 25 à 50 jours post insémination. A partir du premier on déduit les taux de vrais négatifs et de faux positifs, tandis qu'à partir du deuxième on déduit les taux de vrais positifs et de faux négatifs. A cet effet, et à partir de ces différents taux positif et négatif, on procède à la validation de ce kit en évaluant la sensibilité, la spécificité, l'exactitude positive, l'exactitude négative et enfin la précision. Quoique, avant de procéder à la validation de ce kit comme moyen de diagnostic de gestation, on doit tout d'abord valider la technique de dosage utilisée en évaluant sa reproductibilité (coefficients de variation intra et inter-assay), la récupération, la spécificité et le parallélisme.

Partie Bibliographique

I. L'endocrinologie de la gestation et le développement embryonnaire

Dans la reproduction sexuée, l'œuf issu de la fécondation d'un ovule, est le premier stade de la vie d'un individu. Celui des mammifères placentaires est de type alécithe c'est-à-dire qu'il contient peu de réserves, obligeant l'embryon à établir très tôt des contacts étroits avec l'organisme maternel. Sur ce concept s'articule le devenir de l'embryon qui est au départ qu'un ovule fécondé pour devenir une structure qui se développe de plus en plus jouant le rôle d'un pivot des événements gestatifs pour donner enfin un veau à la naissance indépendant du milieu maternel interne de la vache.

I.1. La fécondation et la vie libre de l'embryon

L'ovule libéré après la rupture folliculaire est capté par le pavillon, puis transféré dans l'oviducte où a lieu la fécondation. Celle-ci est le résultat de la fusion des deux gamètes mâle et femelle aboutissant à la formation d'un *zygote*. De plus, une fois la deuxième division méiotique est achevée par l'émission du second globule polaire, la fécondation a pour effet d'activer l'ovocyte à déclencher les divisions mitotiques, c'est la segmentation. Cette dernière commence 14 à 16 heures après la pénétration spermatique chez la vache (Derivaux et Ectors, 1980). Entouré dans sa zone pellucide, l'œuf entame sa descente vers l'utérus tout en se divisant en 2, 4, 8, 16, 32, ... cellules appelées *blastomères*. Au bout de quatre jours après la fécondation, la masse sphérique formée par les blastomères dite *morula*, arrive dans l'utérus. A partir du stade de 32, 64 cellules, les blastomères se différencient en cellules internes polaires et en cellules externes apolaires. La lignée interne est à l'origine du bouton embryonnaire (futur fœtus) et la lignée externe génère le *trophoblaste* (le *trophectoderme*) sous forme d'un épithélium aplati qui participe à la formation du futur placenta. Ces cellules (polaires et apolaires) vont s'organiser pour former le *blastocyste* (*blastula*). En effet, vers le septième jour chez la vache, la morula se creuse d'une cavité remplie de liquide formant ainsi le *blastocœle*. Ce dernier est délimité par un épithélium formé de blastomères polaires et dans l'un de ses pôles, une masse de blastomères apolaires aux cytoplasmes denses forment le bouton embryonnaire. Ce blastocyste à deux pôles (embryonnaire et anti-embryonnaire) est toujours entouré par la zone pellucide, Ce n'est que vers le 10^e au 11^e jour que l'embryon sort de celle-ci pour donner le produit de conception ou *conceptus*. Visiblement, la perte de cette zone pellucide libère l'embryon afin d'entamer la phase d'implantation.

I-2. L'implantation :

Le devenir du développement embryonnaire dépend de l'établissement de relations intimes entre l'endomètre et le *conceptus*. Ainsi, le blastocyste entame sa fixation à la paroi utérine et s'y implique plus ou moins profondément chez la vache. En général, l'implantation se déroule par une succession d'étapes, soit : l'orientation du blastocyste et l'accolement puis l'apposition de celui-ci à la muqueuse utérine et en fin l'adhérence des cellules de trophoblaste aux cellules de la muqueuse utérine suivi de l'invasion de l'endomètre (Guillomot, 2001).

Après la disparition de la zone pellucide et avant l'implantation, on observe une élongation extrêmement rapide du trophoblaste. Chez la vache, l'élongation du blastocyste commence aux environ des jours 12–13 et poursuit jusqu'à ce que le trophoblaste occupe entièrement la lumière de la corne gestante (Betteridge *et al.*, 1980). Au début du processus d'implantation, chez la vache vers le 19^e au 20^e jour de gestation, des microvillosités cellulaires trophoblastiques vont établir les premiers contacts avec l'épithélium maternel. Ces contacts commencent au voisinage immédiat de l'embryon pour s'étendre ensuite à tous le chorion. Selon King et collaborateurs (1982), le processus de l'implantation qui est crucial pour le développement embryonnaire se termine vers le 27^e au 30^e jour post-fécondation. En somme, le trophoblaste définit avec l'organisme maternel par le processus d'implantation, une structure qui permettra au fœtus de se développer au cours de la gestation appelée le placenta.

I-3. Le placenta :

L'implantation entraîne l'invasion de l'endomètre par le trophoblaste aboutissant à la formation d'un organe dont les fonctions seront de nature protectrice, nutritive, respiratoire, endocrinienne et immunodépressive (King *et al.*, 1982). Cet organe n'est plus que le placenta qui peut être défini comme étant l'apposition et/ou la fusion des cellules épithéliales de l'endomètre et du trophoblaste destinées à établir un contact intime entre la mère et le fœtus.

En effet, l'enveloppe la plus externe du *conceptus*, le chorion, présente sur sa surface externe des microvillosités cotylédonaire qui s'engrènent dans des formations spécialisées de la muqueuse utérine pour donner naissance aux placentômes, véritables surfaces d'attache utéro-placentaire. Les espaces inter-cotylédonaire lisses forment le paraplacenta. L'ensemble des éléments, placentômes et paraplacenta, concourt à former le placenta dans son entièreté.

Le placenta est un organe autonome et transitoire mais primordial. De plus, il cumule des fonctions qui, chez l'adulte, sont assurées par les poumons, les reins et les intestins. Mais aussi, il est considéré comme une véritable glande endocrine indispensable à l'initiation et au maintien de la gestation ainsi qu'à la croissance fœtale. Par ailleurs, il est également considéré comme une structure particulièrement intéressante sur le plan immunologique, puisqu'il met en œuvre des stratégies permettant la tolérance des antigènes fœtaux par l'organisme maternel.

La situation topographique du placenta et sa structure varient avec les espèces. Cette variation résulte du type d'implantation de l'œuf. La structure de placenta peut ainsi être étudiée sur un double plan anatomique et histologique.

Différentes classifications du placenta ont été proposées en fonction de trois (03) critères qui se recouvrent partiellement, soit :

- En fonction de sa structure : définie par le type de rapport entre le trophoblaste et l'endomètre.
- En fonction de sa morphologie : définie par la forme d'attachement des villosités placentaires.
- En fonction de son degré d'attachement : défini par les altérations de l'endomètre lors de la parturition.

Chez certaines espèces notamment les équidés et suidés, l'étape d'adhérence des membranes représente la phase ultime du processus d'implantation conduisant à une placentation de type épithéliochorial et de forme diffus sur le plan anatomique. Chez d'autres, l'implantation est plus invasive conduisant à des degrés de pénétration différents dans les couches histologiques de la paroi utérine (Guillomot, 2001). En effet, le placenta est de type endothéliochorial et zonaire chez les carnivores et hémochorial discoïde chez les rongeurs et les primates. Par contre, chez les ruminants, le placenta est de type synépithéliochorial cotyledonnaire (Guillomot, 2001). En outre, sur le plan histologique il est capital de mentionner que les placentas de ces derniers sont caractérisés par leur richesse en cellules binucléées (Wooding, 1992).

I-4. Les cellules binucléées :

Les cellules binucléées apparaissent chez la vache vers le 18^e et 19^e jour après la fécondation. Elles sont localisées juste près de la jonction fœto-maternelle (Wooding *et* Wathes, 1980). Les cellules binucléées dérivent des cellules mononucléées trophoblastiques ayant subi une division du noyau sans la division cytoplasmique (Wooding, 1992). En plus de la distinction remarquable par le nombre de noyaux qu'elles contiennent, les cellules binucléées se caractérisent par un cytoplasme dense, riche en ribosomes, parsemées de grosses granulations et par la présence d'un appareil de golgi très développé (Boshier *et* Holloway, 1977).

Au niveau du trophéctoderme, le nombre de cellules binucléées augmente jusqu'à un maximum de 20 % des cellules trophoblastiques. Cette proportion reste ensuite constante jusqu'à la mise-bas (Boshier, 1969). Parallèlement à leurs rôles joués dans le maintien des épithéliums fœtal et maternel l'un contre l'autre de façon à permettre le développement des inter-digitations microvillositaires, le transfert des granules semble être la raison principale de la migration des cellules binucléées (Wooding *et* Wathes, 1980). En suite, elles fusionnent avec les cellules épithéliales utérines pour donner des cellules tri-nucléées qui dégèrent aussitôt que leurs contenus soient libérés dans la circulation maternelle (Wooding, 1984).

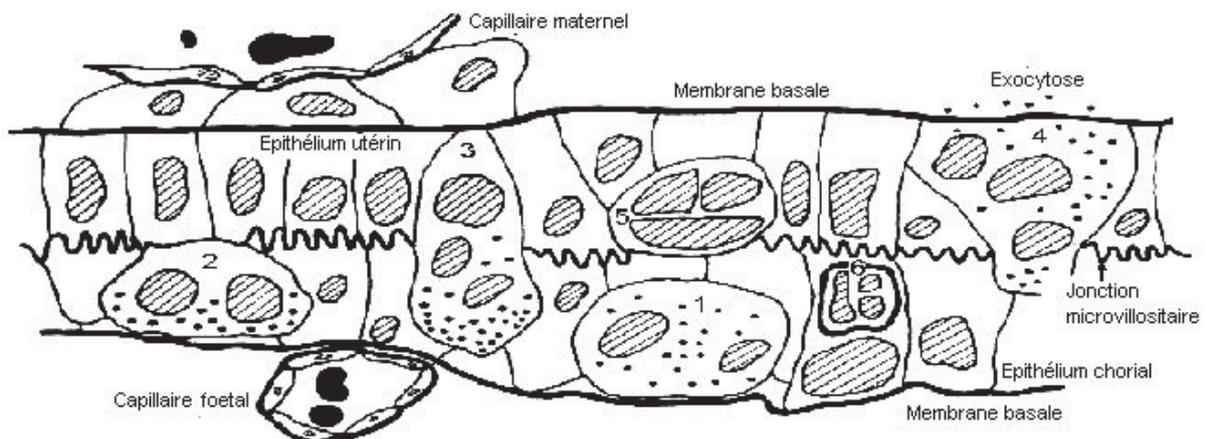


Figure n°1: représentation schématique de la migration des cellules binucléées chez la vache (d'après Wooding *et* Wathes, 1980).

Les cellules binucléées sont directement impliquées dans la synthèse de nombreuses protéines dont certaines ont un rôle hormonal connu telles que l'hormone lactogène

placentaire (PL) (Wooding *et al.*, 1992), la gonadotrophine chorionique (CG) et les hormones stéroïdes (Zoli, 1992b), la progestérone (Wooding *et al.*, 1996), des prostaglandines (Reimers *et al.*, 1985) et des protéines associées à (ou spécifiques de) la gestation (Zoli *et al.*, 1991).

I-5. Les protéines associées à (ou spécifiques de) la gestation :

I-5-1. Historique et taxonomie :

Les premières publications sur les protéines spécifiques de la gestation ont été décrites dans les années 80 sous divers appellations (PSPB, PSP-60, PAG, SUB-3). En effet, des recherches effectuées par Bulter et collaborateurs (1982) chez les ruminants domestiques ont abouti à l'isolement à partir des enveloppes fœtales bovines de deux protéines spécifiques de la gestation : PSPA et PSPB. Néanmoins, la PSPA, une protéine de masse moléculaire de 65 à 70 kDa s'est révélée ultérieurement identique à l'alphafoetoprotéine (AFP); protéine synthétisée par le foie du fœtus de tous les mammifères (Giltlin *et Boesman*, 1967). Les concentrations sériques maternelles d'AFP (PSPA) sont élevées pendant la gestation. Cependant, des concentrations non négligeables de cette protéine sont détectées en dehors de la gestation, ce qui empêche l'utilisation de leur dosage comme moyen de diagnostic de la gestation. Par contre pour la PSPB, une glycoprotéine de masse moléculaire de 47 à 63 kDa, il a été rapidement montré qu'elle est présente dans le sang maternel et que son dosage pouvait permettre un diagnostic de gestation chez les femelles de nombreuses espèces de ruminants (Sasser *et al.*, 1989).

Une équipe de chercheurs a isolé une protéine placentaire de poids moléculaire d'environ 30 kDa et ayant une activité biologique apparentée à celle de LH bovine (Ailenberg et Shemesh, 1983). Ils ont donc conclu à l'existence d'une hormone chorionique gonadotrope bovine (bCG) dont le rôle était vraisemblablement d'assurer le maintien du corps jaune gestatif chez la vache. Ultérieurement, Beckers et collaborateurs (1988) ont confirmé l'existence de cette protéine présentant des points communs avec la LH. Parallèlement, une autre protéine placentaire dépourvue d'activité hormonale a été mise en évidence chez la vache par la même équipe. Puis, elle a été isolée, purifiée et caractérisée par Zoli et al. en 1991 et fut dénommée *bovine pregnancy associated glycoprotein 1 (bPAG-1)*.

D'autre part, des études approfondies ont conclu que le bCG fait partie de la famille des glycoprotéines spécifiques ou associées à la gestation et fut appelée *bPAG-2* (Xie *et al.*, 1994). Plus tard, une approche par clonage moléculaire a permis de caractériser ces deux molécules

(bPAG-1 et bPAG-2) qui se sont révélées partager plus de 60% d'identité dans leurs séquences d'acides aminés (Xie *et al.*, 1991). Cependant, aucune réaction croisée n'a été détectée de point de vue immunologique entre ces deux molécules.

En 1986, Gogolin-ewens et son équipe ont identifié pour la première fois les molécules SUB-3 (antigène spécifique des cellules binucléées de l'utérus gravide) qui font partie de la famille des protéines associées à la gestation et qui sont considérées restant confinées dans les cellules binucléées et, de ce fait, elles n'ont pas fait l'objet de développement pour le diagnostic de gestation.

En 1988, Camous *et al.* ont parvenu à isoler et purifier une autre protéine spécifique de la gestation : la PSP-60 dont le poids moléculaire est de 61 kDa. Plus tard, Mialon et collaborateurs (1993) s'est intéressé par l'aspect de la sécrétion de cette molécule dans le sang maternel pour développer un éventuel dosage de diagnostic de gestation.

Selon Zoli et son équipe (1992b), cette protéine (PSP-60) pourrait être une forme de la famille de la PSPB. D'autre part, Lynch et collaborateurs (1992) ont montré par clonage moléculaire qu'une forme de PSPB est, par sa structure primaire, apparentée à la bPAG-1. Aujourd'hui, dans les banques génomiques, la bPAG-1 (Zoli *et al.*, 1991), et la bPSPB (Bulter *et al.*, 1982) sont considérées comme ayant la même séquence en acides aminés et il en est probablement de même pour la PSP-60 et la SUB-3. D'ailleurs, pour éviter toute confusion, Green et collaborateurs (2005) ont suggéré la bPAG-1 comme référence pour différentes PAGs (PSPB, PSP-60, SUB-3) puisqu'elles présentent des similitudes importantes d'identité dans leurs séquences d'acides aminés et parfois même identiques (Xie *et al.*, 1991; Lynch *et al.*, 1992).

I-5-2. Caractéristiques biologiques :

L'existence des protéines associées à la gestation (PAGs) apparait commune à l'espèce humaine et aux différentes espèces animales. En effet, ces protéines ont été retrouvées chez l'homme (Tatarinov *et Masyukevich*, 1970), les singes (Bohn, 1974), le rat, le lapin et le cobaye (Tatarinov *et al.*, 1976), le porc (Szafranska *et al.*, 1995), le chat (Gan *et al.*, 1997), le cheval (Green *et al.*, 1999), la souris (Chen *et al.*, 2001). Mais aussi, elles ont été retrouvées également chez les ruminants comme les bovins (Zoli *et al.*, 1991), les ovins (Xie *et al.*, 1997), les caprins (Garbayo *et al.*, 1997), le cerf et l'élan (Huang *et al.*, 1999) et le zébu (Sousa *et al.*, 2000).

La PAG-1 est une glycoprotéine acide de la famille des protéases aspartiques mais elle est dépourvue d'activité protéolytique (Zoli *et al.*, 1991). Elle est au même titre que le

pepsinogène, la pepsine, la cathepsine D et E, la chymosine et la rénine (Xie *et al.*, 1991). Sur le plan nucléotidique, elle possède une identité de 60% avec le pepsinogène et la cathepsine E, de 57% avec la chymosine et de 50% avec la cathepsine D (Zoli *et al.*, 1992b). En outre, cette glycoprotéine de 380 acides aminés est de masse moléculaire de 67 kDa (Zoli *et al.*, 1992b). En réalité cette masse varie de 55 à 70 kDa. Cette variation correspond à différentes formes et aux niveaux de glycosylation de celles-ci (Clerget, 2008). Ainsi, les PAGs comportent de multiples sites N-glycosylation, ce qui leur confère une grande stabilité et longue demi-vie dans la circulation maternelle qui est de 8 à 10 jours (Sasser *et al.*, 1986; Kiracofe *et al.*, 1993). De ce fait, l'hétérogénéité des PAGs isolées à partir du placenta de différentes espèces animales pourrait s'expliquer, du moins en partie, par un degré variable de glycosylation effective des sites potentiels. La bPAG-1 contient environ 10% d'hydrate de carbone et 1% d'acide sialique (Zoli *et al.*, 1992b). Ce dernier semble influencer sensiblement l'immunoréactivité de la PAG puisque les propriétés immunogènes de cette glycoprotéine soient inversement proportionnelles à la quantité d'acides sialiques qu'elle contient (Zoli *et al.*, 1992b).

La variété de structure des motifs saccharidiques permet à ces molécules d'exister sous une multitude de formes présentant des propriétés structurales et biologiques différentes. Par ailleurs, si l'approche biochimique a permis d'identifier grossièrement une molécule chez les bovins (bPAG-1) (Zoli *et al.*, 1991; Sousa *et al.*, 2002), l'approche par biologie moléculaire a permis d'identifier des dizaines d'ADN complémentaires codants pour différentes PAGs ayant au moins 5% de différence dans leurs séquences (Green *et al.*, 2000): 21 ADNc chez la vache (Xie *et al.*, 1997).

Les PAGs les mieux connues sont synthétisées par les cellules binucléées présentes dans les couches superficielles du trophoblaste (Zoli *et al.*, 1992b) et plus précisément dans les granules de ces cellules binucléées (Xie *et al.*, 1991; Zoli *et al.*, 1992b). Chez la vache, les cellules binucléées superficielles du trophoblaste migrent en direction de l'épithélium utérin puis fusionnent avec les cellules endothéliales pour donner naissance aux cellules trinucléées (Wooding *et Beckers*, 1987). Ces dernières ont une durée de vie transitoire et fugace puisque elles meurent aussitôt que le contenu de leurs granules est largué dans la circulation maternelle (Zoli *et al.*, 1992b).

Récemment, les progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de démontrer que les PAGs ne s'expriment pas au même moment. Au cours de la gestation, certaines PAGs s'expriment alors que d'autres sont absentes sauf, vers la fin de la gestation, où

toutes les PAGs peuvent s'exprimer au même temps. Une étude de clonage moléculaire réalisée par Green et collaborateurs (2000), a démontré que l'expression des bPAGs révèle un caractère aussi bien spatial que temporel durant la gestation. En effet, deux groupes émanent de la classification spatiale de l'expression des bPAGs. Le premier comprend des bPAGs exclusivement localisées dans les cellules binucléées, alors que le second correspond aux bPAGs synthétisées dans les cellules mononucléées du trophéctoderme (Green *et al.*, 2000).

	Cellules binucléées	Cellules mononucléées
bPAGs	1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21	2, 8, 10, 11, 12, 13,

Tableau 1. mode d'expression spatiale des bPAGs (Green *et al.*, 2000).

La diversité de la famille des bPAGs est devenue évidente. Les avancées scientifiques et les connaissances acquises dans ce domaine ont motivé davantage les chercheurs à purifier ces molécules afin de développer des dosages radio-immunoassay (RIA) ou enzymo-immunoassay (ELISA) sensibles et spécifiques. Le principe consiste à purifier des molécules de bPAGs qui possèdent la propriété d'être secrétées précocement et au même temps disparaissent assez tôt après le vêlage pour pallier à l'inconvénient majeur de longue demi-vie des PAGs. Des équipes de chercheurs (Bulter *et al.*, 1982 ; Zoli *et al.*, 1991 ; Mialon *et al.*, 1993) se sont intéressés à la cinétique de différentes formes de PAGs dans le sang maternel pendant la gestation et même après le post-partum. Chez la vache, les concentrations en bPAG sont détectables au plus tôt à partir de 19^e-22^e jours après conception (Perenyi, 2002b). Leurs concentrations est habituellement inférieures à 1 ng/ml avant le 30^e jour de gestation. Puis, elles progressent pour atteindre des concentrations de 3 à 6 ng/ml aux alentours de 33^e-37^e jours de gestation (Perenyi *et al.*, 2002a). Néanmoins, la précocité de ce moment de détection varie cependant d'un individu à l'autre car il existe de grandes variations individuelles dans la sécrétion et la cinétique d'évolution des PAGs. Au delà de 35^e jour, les concentrations de la PAG augmentent d'abord progressivement entre la 6^e et 35^e semaine pour ensuite s'élever plus rapidement entre la 35^e semaine et le terme. Les concentrations des PAGs augmentent de 4 ng/ml à la 6^e semaine jusqu'à 159 ng/ml à la 35^e semaine puis atteignent leurs valeurs maximales de 2000 ng/ml 1 à 5 jours avant le part. Après le vêlage, les concentrations sériques de PAG décroissent progressivement et reviennent au dessous de

seuil de détection (0,2 ng/ml) entre le 80^e jour et le 120^e jour post-partum (Zoli *et al.*, 1992b). Dès lors, il est impératif de respecter une période d'attente de 100 jours après la parturition pour envisager un diagnostic d'une nouvelle gestation. Autrement dit, pendant la période de post-partum, le dosage de la PAG est réalisable pour le diagnostic d'une nouvelle gestation mais à condition que l'intervalle vêlage insémination soit supérieur à 70 jours tout en sachant qu'en pratique, le prélèvement est généralement effectué 30 à 35 jours après l'insémination.

Selon plusieurs auteurs, l'évolution des concentrations des PAGs peut être influencée par plusieurs facteurs comme la race (Guilbault *et al.*, 1991) et le sexe (Guilbault *et al.*, 1991; Zoli *et al.*, 1992b). De plus, les concentrations plasmatiques de PAG sont aussi corrélées avec le poids du veau à la naissance ainsi que le nombre du fœtus (Dobson *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 1997), la masse placentaire (Willard *et al.*, 1995), la production laitière et sans doute le stade de gestation (Lopez Gatus *et al.*, 2007a).

I-5-3. Rôles des PAGs :

Selon des expériences préliminaires, les PAGs font sans nul doute partie des molécules qui interviennent dans le dialogue entre l'endomètre et l'embryon (Wooding *et al.*, 2005). Cependant, bien que des investigations aient été menées, les rôles physiologiques de ces protéines restent encore à l'état d'hypothèse.

Plusieurs équipes de chercheurs ont mené des travaux afin de déceler les rôles biologiques et physiologiques des PAGs. En effet, Roberts et collaborateurs (1996) ont formulé plusieurs hypothèses dont celle selon laquelle les PAGs pourraient lier et séquestrer des peptides susceptibles d'être reconnus par le complexe majeur d'histocompatibilité, et ainsi exerce un rôle immunomodulateur au niveau de l'interface foeto-maternelle. Dans la même optique, Dosogne *et al.* (2000) ont attribué aux PAGs la chute de résistance ainsi que la susceptibilité au syndrome métrite-mammite fréquemment observé chez la vache au tour du part imputé aux concentrations très élevées de PAG en cette période qui, vraisemblablement engendre une décroissance de l'activité d'oxydation des neutrophiles (Moreira Da silva *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été montré que des concentrations de PAG-1 supérieure à 1800 ng/ml affectent la capacité des granulocytes (Hoeben *et al.*, 2000).

Toutes les investigations réalisées jusqu'à présent pour définir les fonctions des protéines spécifiques ou associées à la gestation ont été testées sur le modèle bovin. Ces travaux de recherche ont rapporté que la PSPB stimule la production de PGE₂ qui elle-même joue un rôle décisif dans le maintien de l'activité du corps jaune gestatif et par conséquent, la production lutéale de la progestérone (Del vecchio *et al.*, 1996; Weems *et al.*, 1998) . D'autre

part, Ayad et collaborateurs (2007b) ont suspecté une relation possible entre la sécrétion de la progestérone et les concentrations en PAGs. En effet, dans une étude réalisée chez des vaches laitières, il a été observé que les concentrations en PAG aux jours 30, 45, 60 et 80 ont tendance à être plus hautes chez les vaches gestantes ayant des concentrations en progestérone plus élevées au jour 21 de la gestation. Récemment, Barbato et son équipe (2013) ont confirmé l'existence d'une relation entre la sécrétion de la PAG et celle de la progestérone chez les vaches au cours du premier trimestre de gestation.

Le rôle exact de ces protéines n'est pas encore élucidé. Leurs propriétés immunosuppressives expliqueraient leurs implications dans le mécanisme de reconnaissance et du maintien de la gestation. Compte tenu de leur appartenance à la famille des protéases aspartiques, ses effets potentiels sur le mécanisme de déclenchement de la mise bas, de détachement placentaire et l'involution utérine mériteraient d'être approfondis.

I-5-4. Les applications cliniques des PAGs

Dès le début de la gestation, le placenta synthétise toute une série de protéines associées à la gestation. Lorsque ces molécules sont secrétées dans le sang maternel à des niveaux détectables, elles présentent un intérêt pour le diagnostic de la gestation et de la fonction placentaire. Les protéines associées à la gestation ont été proposées pour la première fois comme moyen de diagnostic de la gestation chez les bovins (Zoli *et al.*, 1991) puis ensuite, chez de nombreuses espèces de ruminants (Gonzalez *et al.*, 2001 ; Karen *et al.*, 2003 ; Barbato *et al.*, 2009). Rapidement, il a été montré que ces protéines étaient présentes dans le sang maternel et que leur dosage radio-immunologique pouvait permettre un diagnostic précoce de gestation (Sasser *et al.*, 1986; Zoli *et al.*, 1992b). La mise au point de ce dosage (RIA) et celui d'immuno-enzymatique (ELISA) a rendu l'intérêt particulièrement évident pour diagnostiquer les gestations et les altérations trophoblastiques. D'ailleurs, des recherches ont été menées dans ce sens pour l'étude de la mortalité embryonnaire après insémination artificielle (Szenci, 2006), saillies naturelles (Breukelmen *et al.*, 2005a) ou transfert d'embryon (Breukelmen *et al.*, 2005b). Dans ces études, des dosages de la PAG sont annexés par des dosages de la progestérone puis suivis par des examens ultrasonographiques. Les résultats rapportés montrent que les concentrations en PAG chutent chez des vaches dont la gestation a été initialement diagnostiquée par échographie comme positif et ensuite négatif suite à une mortalité embryonnaire ou foetale comme l'en témoignent aussi la chute des concentrations en progestérone.

Des approches originales ont été menées par certains chercheurs sur l'effet d'infection par les agents abortifs sur les concentrations des PAGs en l'occurrence, *Actinomyces pyogenes* (Semambo *et al.*, 1992), *Toxoplasma gondii* et *Listéria monocytogenes* (Zarrouk *et al.*, 1999) et *Néospora caninum* (Lopez Gatius *et al.*, 2007b). Ces auteurs ont décrit des cinétiques et des allures de chute des concentrations de PAG différentes ainsi que le moment de la survenue des avortements induits, appropriés à chaque agent pathogène.

Ces travaux fournissent un outil pratique pour le diagnostic différentiel des pathologies abortives. Le cas échéant, il permet au moins une orientation ou une confirmation du diagnostic. En effet, le dosage de la PAG au long de la gestation, combiné à celui de la progestérone, permet de préciser le moment d'occurrence des mortalités embryonnaires ou fœtales. Ce type d'approche est recommandable aussi bien en ferme (Lopez Gatius *et al.*, 2007c) que dans les stations expérimentales utilisant les biotechnologies de la reproduction (Chavatte- palmer *et al.*, 2006) dans le but d'élucider la chronologie et la pathogénie des pertes prénatales et même éventuellement leurs agents causaux.

Des études ont montré que, malgré la plus part des nouveau-nés ne présentent aucune anomalie particulière suite à des programmes de manipulation d'embryons (clonage, FIV,...etc.), une grande partie d'entre eux peut présenter un poids élevé à la naissance suite à un développement en excès de l'unité fœto-placentaire accompagnés généralement par la présence d'anomalies morphologiques accessoires telles que l'œdème du cordon ombilical et l'hypertrophie placentaire (Chavatte - Palmer *et al.*, 2006). Ces altérations semblent être à l'origine de concentrations très élevées en PAG à la fin de la gestation (Dobson *et al.*, 1993). De même, le dosage de la PAG peut être également utile pour le dénombrement des fœtus (Patel *et al.*, 1997). Dans ce cas, les concentrations de PAG sont également élevées chez les femelles à gestation multiples (Patel *et al.*, 1997; Lopez-Gatius *et al.*, 2007a).

En fin, différentes études indiquent que les concentrations des PAGs dans le lait peuvent être utilisées pour le diagnostic de gestation chez les ruminants. En effet, les premiers essais d'élaborer un dosage pour le diagnostic de gestation à base d'analyse de PAG dans le lait sont effectués chez l'espèce caprine (Gonzalez *et al.*, 2001) et ovine (El Amiri *et al.*, 2003) et récemment chez l'espèce bovine par dosage radio-immunologique (RIA) (Gajewski *et al.*, 2008) ou enzymo-immunologique (ELISA) (Friedrich *et Holtz*, 2010). Des résultats publiés par Tainturier et collaborateurs (1996) ont confirmé la présence des bPAGs dans le lait. Néanmoins, l'étude réalisée par Gajewski *et al.* (2008), montre que la concentration moyenne de bPAG obtenue dans le lait est de l'ordre de 0,06 ng/ml à la 6^e semaine post-

insémination. Et selon Metelo et collaborateurs (2002; 2004), cette concentration varie de 0,1 à 0,3 ng/ml à la 10^e semaine (70 jours) post-insémination. Puis elle grimpe de 1,28 ng/ml à la 24^e semaine (168 jours) jusqu'à 4,84 ng/ml au jour 201 de gestation (Gajewski *et al.*, 2008). Ces concentrations infimes semblent contraires à celles enregistrées chez les caprins qui sont, une dizaine de fois plus élevées que celles des bovins (Gonzalez *et al.*, 2001). En effet, elles varient de $2,12 \pm 1,11$ ng/ml à la 3^e semaine jusqu'à $4,65 \pm 1,42$ ng/ml à la 6^e semaine de gestation (Gonzalez *et al.*, 2001).

Cet inconvénient majeur concernant les concentrations des bPAGs dans le lait a rendu l'éventualité de développer un dosage radio-immunologique (RIA) ou enzymo-immunologique (ELISA) précoce est quasiment impossible d'au moins à l'heure actuelle. D'ailleurs, le dosage immuno-enzymatique (ELISA) développé par Friedrich *et Holtz* (2010) est fiable à 28 jours post-insémination dans le sang alors que dans le lait, il l'en est qu'à partir de 150 jours de gestation.

Les connaissances acquises sur les aspects relatifs à l'endocrinologie de la gestation, notamment dans le diagnostic et le suivi de la gestation ainsi que l'étude des mortalités embryonnaires, ont fortement évolué grâce au développement de différents systèmes de dosage RIA-PAG homologues et hétérologues (Zoli *et al.*, 1992a; Perényi *et al.*, 2002a; Ayad *et al.*, 2007a) et ELISA-PAG (Green *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2009; Romano *et Larson*, 2010).

II. Généralités sur la technique ELISA :

La technique ELISA a été conceptualisée et développée par deux scientifiques suédois Peter Perlmann et Eva Engvall à l'université de Stockholm en 1971. Le mot ELISA est l'acronyme d'un examen de laboratoire qui signifie en anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur un support solide. Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (*enzyme immunoassays*), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré dont l'intensité peut être estimée par spectrophotométrie.



Figure n° 2: représentation d'une plaque ELISA de 96 puits prête à la lecture.

Le test ELISA est une technique immuno-enzymatique destinée pour la détection et le dosage des anticorps et des antigènes dans des liquides biologiques. Cette technique est basée sur l'utilisation d'un ou de deux anticorps dont l'un est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre qui est couplé préalablement à une enzyme, réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) pour causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène.

L'ELISA peut être réalisée à visée qualitative en indiquant seulement la présence ou l'absence d'une protéine dans un échantillon. Comme elle peut être utilisée à visée quantitative dont la densité optique ou les unités de fluorescence de l'échantillon mesurées par spectrophotométrie sont proportionnelles à la concentration de la protéine cible et qui peut

être déduite sur une courbe d'étalonnage. D'autre part, différentes types d'ELISA sont utilisées aussi bien en recherche qu'en clinique, à savoir :

1. L'ELISA direct (sandwich) : appelée aussi DAS (*Double Antibody Sandwich*). Ce type d'ELISA est destiné pour la révélation ou le dosage d'antigène dans un échantillon. Dans ce cas de figure, l'antigène se trouve entre deux anticorps spécifiques. En effet, les puits de la plaque ELISA sont tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée *coating*, l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et si l'antigène recherché est présent, il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture. Un deuxième anticorps, dit traceur ou anticorps de détection, capable de se lier à l'antigène capturé est alors ajouté dans les puits. Puis, les anticorps de détection non fixés sont éliminés par rinçage. L'anticorps traceur fixé est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène puisque le nombre de molécules d'anticorps traceur fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes immobilisées par l'anticorps de capture.

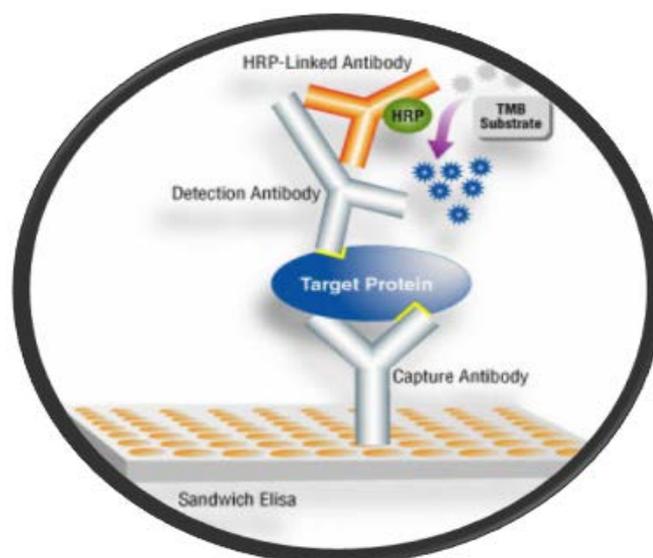


Figure n° 3: schéma de la réaction antigène-anticorps de l'ELISA sandwich.

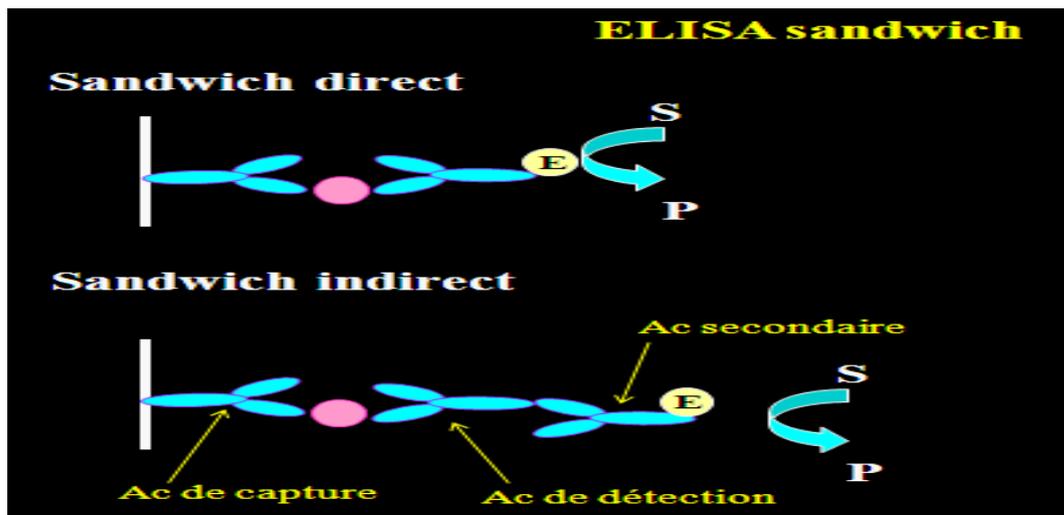
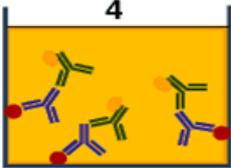


Figure n° 4: représentation schématique des réactions de sandwich direct et sandwich indirect.

2. L'ELISA indirect: ce type d'ELISA est plus couramment utilisé. Il sert pour déterminer la concentration en anticorps d'un sérum. Cette variante d'ELISA se déroule en général par quatre étapes qui sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau n° 2: les étapes de réalisation de l'ELISA indirect.

<p>1</p>	<p>« coating » de l'antigène</p>	<p>Incubation dans les puits la solution des antigènes spécifiques de l'anticorps recherché. L'antigène se fixe au fond des puits. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer l'antigène en excès.</p>
<p>2</p>	<p>Fixation de l'anticorps à doser</p>	<p>Incubation dans les puits la solution d'anticorps à doser. L'anticorps se fixe spécifiquement sur l'antigène. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer l'anticorps non fixés.</p>
<p>3</p>	<p>fixation de l'anticorps de détection</p>	<p>Incubation dans les puits l'anticorps de détection, couplé à une enzyme. L'anticorps de détection se fixe sur l'anticorps à doser. Les puits sont ensuite lavés pour enlever les anticorps de détection en excès non fixés.</p>

	Révélation des anticorps fixés	Incubation d'une solution révélatrice contenant un substrat de l'enzyme. Si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), le substrat est dégradé et une coloration apparaît. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente, donc à la concentration de l'anticorps recherché.
---	--------------------------------------	---

3. L'ELISA par compétition:

Une troisième utilisation de l'ELISA se fait par compétition de liaison. Elle permet le dosage des antigènes. Le procédé se déroule, dans ses grandes lignes, comme suit :

- Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps.
- Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
- La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.

La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps. Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort.

Partie Expérimentale

I. Matériels et méthodes

I.1- Le cadre expérimental

La présente étude a été menée au niveau de trois wilayas : Bejaïa (36° 45'. N et 5° 04'. E), Biskra (34° 51'. N et 5° 43'. E) et Tizi-Ouzou (36° 43'. N et 4° 03'. E). Les animaux ont été élevés dans des systèmes extensif et semi-intensif, appartenant à des particuliers dont la plus part sont des producteurs laitiers. L'expérimentation s'est déroulée au Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Bejaïa).

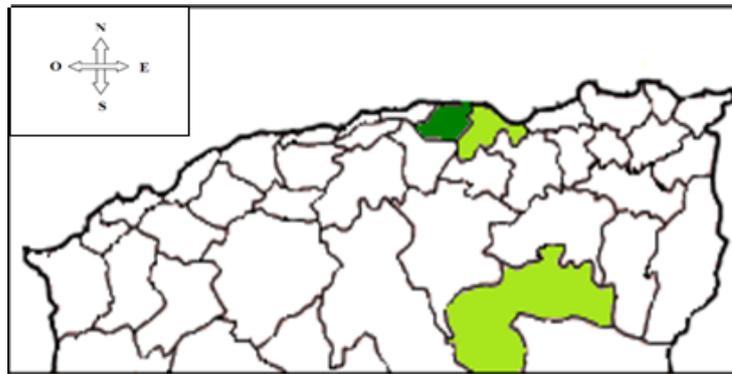


Figure n° 5: carte géographique illustrant les wilayas dont les prélèvements ont été effectués (Bejaïa, Biskra et Tizi-Ouzou).

I.2- Animaux et prélèvements

Au cours de cette étude, 120 prélèvements de sang ont été effectués au niveau de la veine coccygienne des bovins de races différentes, âgés entre 6 mois à 12 ans. La note d'état corporel (BCS) enregistrée varie de 2,5 à 4,5 et le nombre de vêlages varie de 0 à 9. Ces échantillons ont été repartis en deux groupes comme suit:

Groupe 1: des prélèvements issus de lot de femelles non gestantes (n=52). Les prélèvements ont été collectés durant la période de stabulation et en absence du mâle.

Groupe 2: des prélèvements issus de lot de femelles inséminées, confirmées ultérieurement gestantes par échographie ou par palpation transrectale (35-40 et ≥ 60 j post IA, respectivement) (n=68). Les prélèvements ont été effectués entre 25 à 50 jours post-insémination.

Nous signalons que toutes les vaches du groupe 1 et 2 ont un intervalle vêlage et le jour de prélèvement supérieur ou égal à 98 jours.

Toutes les femelles ont fait l'objet d'un prélèvement de sang dans des tubes secs de 10 ml identifiés préalablement. Une vache (N° 36) a été prélevée plusieurs fois dans le but de suivre la cinétique des concentrations de la PAG sérique. Les échantillons sanguins ont été centrifugés à 3000 tours par minute pendant 15 minutes. Les sérums obtenus sont récupérés et répartis dans deux tubes. Ils sont ensuite conservés à -20°C dans un congélateur jusqu'au dosage de la PAG.

Par ailleurs, cinq prélèvements ont été utilisés pour le test de conservation. En effet, en plus de l'échantillon conservé à -20°C , des échantillons de sérum issus de ces cinq prélèvements ont été mis à 37°C et à la température ambiante ($\sim 24^{\circ}\text{C}$) pendant 18 heures avant le dosage.

I.3- Dosage des prélèvements

Les concentrations sériques de PAG ont été déterminées par un kit ELISA sandwich directe (EIA PAG (E.G.7), CER Groupe, Département santé, Belgique). Ce kit est constitué d'une plaque de 96 puits dans lesquels collé l'anticorps primaire. A cette plaque s'ajoute 14 fioles contenant des réactifs nécessaires qui sont les suivants :

- 07 fioles jaunes contenant les solutions standards (0 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,5 et 2 ng/ml) et le contrôle positif ou *Quality control* (1 ng/ml).
- 01 fiole bleue contenant l'anti-PAG-biotin (l'anticorps secondaire).
- 01 fiole rouge contenant avidin-HRP (l'enzyme).
- 01 fiole contenant la solution substrate/chromogen (révélateur).
- 01 fiole contenant la solution stop (H_2SO_4 : stoppeur de la réaction).
- 02 fioles contenant la solution de rinçage.
- 01 fiole contenant le tampon de dilution.



Figure n° 6: photo présentant les éléments composant le kit (la plaque à 96 puits, les solutions standards, les réactifs, la solution de rinçage et le tampon de dilution).

Après décongélation des sérums, Au premier lieu, un volume de 50 μ l de tampon de dilution est ajouté aux 96 puits suivi de 50 μ l en duplicate de chaque point du standard et contrôle positif. Pareillement, 50 μ l d'échantillon en duplicate ont été mis dans les puits. Ensuite, la plaque est laissée en incubation dans l'obscurité et à température ambiante pendant toute la nuit. Le lendemain la plaque est rincée en ajoutant 300 μ l de la solution de rinçage à chaque puits, puis vidée avant qu'elle soit remplie à nouveau. Cette opération est répétée cinq (05) fois, puis elle est posée sur un papier absorbant pour éliminer le liquide résiduel.

Un volume de 100 μ l de l'anti-PAGbiotin est ajouté à chaque puits suivi immédiatement d'une incubation de deux heures dans l'obscurité et à température de 37° C. Ensuite, la plaque est rincée à nouveau cinq (05) fois selon le protocole précédant. Un volume de 100 μ l de l'avidin-HRP est ajouté à chaque puits suivi d'une incubation de 20 minutes dans l'obscurité et à température de 37° C. Après un lavage selon le même protocole, 150 μ l de

substrate/chromogen est ajouté à chaque puits. Après un léger vortex, la plaque est laissée à nouveau en incubation dans l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. En fin, 50 µl de la solution stop (H_2SO_4) est ajoutée à chaque puits suivi d'une douce agitation et la plaque est prête à la lecture par un lecteur ELISA (spectrophotomètre) à une longueur d'onde de 450 nm.

Le spectrophotomètre mesure les absorbances relatives à chaque concentration de PAG puis imprimées sur papier. Une courbe standard est tracée en fonction des concentrations des solutions standards et leurs absorbances moyennes correspondantes. Sur cette base, les concentrations en PAG des sérums analysés sont déterminées selon l'équation de régression de la courbe standard et en fonction de leurs absorbances moyennes correspondantes.

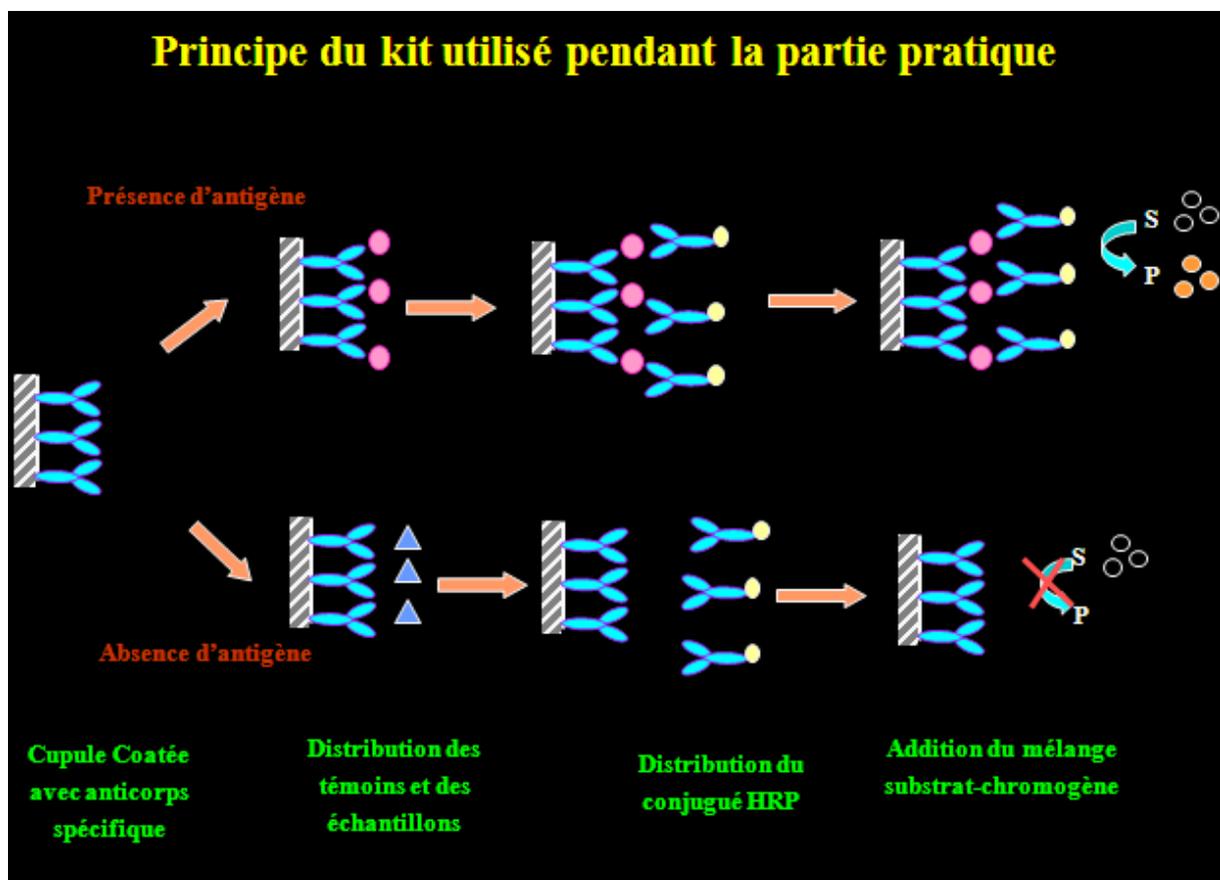


Figure n° 7: illustration schématique du principe du kit ELISA (sandwich direct) utilisé dans cette partie pratique.

I.4 - Validation de la technique de dosage

a- La reproductibilité :

Pour tester la reproductibilité de la méthode, deux (02) échantillons avec différentes concentrations de PAG obtenus à partir des vaches confirmées gestantes ont été employés pour calculer les coefficients de variation (CV) intra et inter-assay. Pour le calcul de CV intra-assay, deux échantillons ont été dosés sept fois (n=7) en duplicate dans un même dosage. Pour le calcul de CV inter-assay, deux échantillons ont été dosés sept fois (n=7) avec des courbes standards différentes et espacées dans le temps. Ainsi, le CV est déterminé par la formule suivante : $CV (\%) = (\text{écart-type} / \text{moyenne}) \times 100$ (Rodbard, 1974).

b- Récupération :

Pour procéder au test de récupération, nous avons utilisé deux sérums A et B dont les concentrations en PAG sont connues d'emblée. Des volumes croissants du sérum B (100 µl, 200 µl, 300 µl et 400 µl) ont été ajoutés au sérum A. Puis nous avons déterminé, en duplicate, la concentration résultante de chaque mélange. Le pourcentage de récupération est calculé comme suit: $[\text{valeur observée (ng/ml)} / \text{valeur prévue (ng/ml)}] \times 100$.

c- La spécificité :

Pour tester la spécificité de la méthode, six (06) molécules représentées par les hormones de la reproduction ont été utilisées en l'occurrence ; PMSG (*FOLLIGON*[®] 1000 UI : Intervet International B.V, (UE)), GnRH (*FERTAGYL*[®] : Intervet International B.V, (UE)), la progestérone (*Progestérone*[®] Retard Pharlou : BAYER SANTE, 13 rue Jean Jaurès 92807 Puteaux cedex, France), la testostérone (*Testo enant*[®] : GEYMONAT S.P.A. Via S, Anna, 2- Anagni (Fr)- Italie), l'ocytocine (*OXYTO-Kel synth*[®] : KELA N.V, St. Lenaartseweg 48, 2320 Hoogstraten- Belgique) et dinoprost (*ENZAPROST*[®] T : CEVA SANTE ANIMALE- 10 avenue de la ballastière- 33500 LIBOURNE- France). Des dilutions (1/1, 1/100, 1/1000 et 1/10000) ont été obtenues en ajoutant une solution tampon pour chaque molécule puis testées en duplicate. Entre outre, nous avons testé un échantillon de sang provenant d'un mâle bovin.

d- Parallélisme :

Pour évaluer le parallélisme de la méthode, nous avons dilué deux (02) sérums, issus de deux (02) prélèvements de femelles confirmées gestantes, contenant des concentrations de PAG relativement élevées dans une solution tampon. Des dilutions sérielles de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 ont été alors obtenues et analysées.

I.5 - Validation de la méthode de diagnostic

L'évaluation objective de la qualité d'une méthode de diagnostic de gestation (DG) repose sur cinq (05) paramètres essentiels dont il importe de connaître la signification (Szenci *et al.*, 1998 ; Kastelic, 2006 ; Romano *et Larson*, 2010). En effet, quatre (04) situations sont possibles pour un animal à examiner:

Tableau 3 : différents cas possibles selon les résultats du diagnostic de gestation.

	Femelle gestant	Femelle non gestant
Diagnostic positif	A (vrai positif)	B (faux positif)
Diagnostic négatif	D (faux négatif)	C (vrai négatif)

- Situation A : le diagnostic de gestation s'est révélé exact (Vrai positif).
- Situation B : le diagnostic de gestation s'est révélé inexact (Faux positif).
- Situation C : le diagnostic de non gestation s'est révélé exact (Vrai négatif).
- Situation D : le diagnostic de non gestation s'est révélé inexact (Faux négatif).

A l'égard de ces quatre (04) situations on définit :

a- La sensibilité :

La sensibilité évalue la capacité de la méthode à détecter les femelles gestantes. Autrement dit, la sensibilité est la probabilité pour une femelle gestante d'avoir un résultat positif au test ou à l'examen. Elle s'exprime par le rapport suivant :

$$Se = \frac{\text{nombre de DG positifs exacts}}{\text{nombre de vaches réellement gestantes}} * 100 = \frac{\text{vrais positifs}}{\text{vrais positifs+faux négatifs}} * 100 = \frac{A}{A+D} * 100$$

b- La spécificité :

La spécificité évalue la capacité de la méthode à détecter les femelles non gestantes. Autrement dit, La spécificité est la probabilité pour une femelle non-gestante d'avoir un résultat négatif au test ou à l'examen. Elle s'exprime par le rapport suivant :

$$Sp = \frac{\text{nombre de DG négatifs exacts}}{\text{nombre de vaches réellement non gestantes}} * 100 = \frac{\text{vrais négatifs}}{\text{vrais négatifs+faux positifs}} * 100 = \frac{C}{C+B} * 100$$

c- Valeur prédictive positive ou exactitude positive:

La valeur prédictive positive est définie comme la probabilité pour une femelle d'être gravide quand le résultat du test ou de l'examen a été déclaré positif. Elle s'exprime par le rapport suivant :

$$VPP = \frac{\text{nombre de DG positifs exacts}}{\text{nombre total de DG positifs}} * 100 = \frac{\text{vrais positifs}}{\text{vrais positifs+faux positifs}} * 100 = \frac{A}{A+B} * 100$$

d- Valeur prédictive négative ou exactitude négative:

La valeur prédictive négative est définie comme la probabilité pour une femelle d'être non gravide quand le résultat du test ou de l'examen a été déclaré négatif. Elle s'exprime par le rapport suivant :

$$VPN = \frac{\text{nombre de DG négatifs exacts}}{\text{nombre total de DG négatifs}} * 100 = \frac{\text{vrais négatifs}}{\text{vrais négatifs+faux négatifs}} * 100 = \frac{C}{C+D} * 100$$

e- L'exactitude totale ou précision :

Elle est définie comme étant la probabilité que les diagnostics posés par la méthode utilisée se révèlent exacts. Elle s'exprime par le rapport suivant :

$$Pr = \frac{\text{nombre de DG positifs exacts} + \text{nombre de DG négatifs exacts}}{\text{nombre total de DG positifs} + \text{nombre total de DG négatifs}} * 100 = \frac{A + C}{A + B + C + D} * 100$$

I.6- Analyse statistique

Les calculs statistiques et les représentations graphiques ont été opérés par le logiciel *Microsoft Excel 2007*. Les résultats obtenus ont été analysés et comparés en utilisant le logiciel SAS (Statistical Analysis System) à des pourcentages au risque de 0,05 %.

II. Résultats

II- 1. Les paramètres de validation technique

Les courbes de régression des différentes séries de dosage par la technique d'ELISA sont parallèles à la courbe standard éditée dans le kit. Les coefficients de corrélation varient de 0,985 à 0,998. Une résultante de l'ensemble des courbes standards a été tracée (Figure 8).

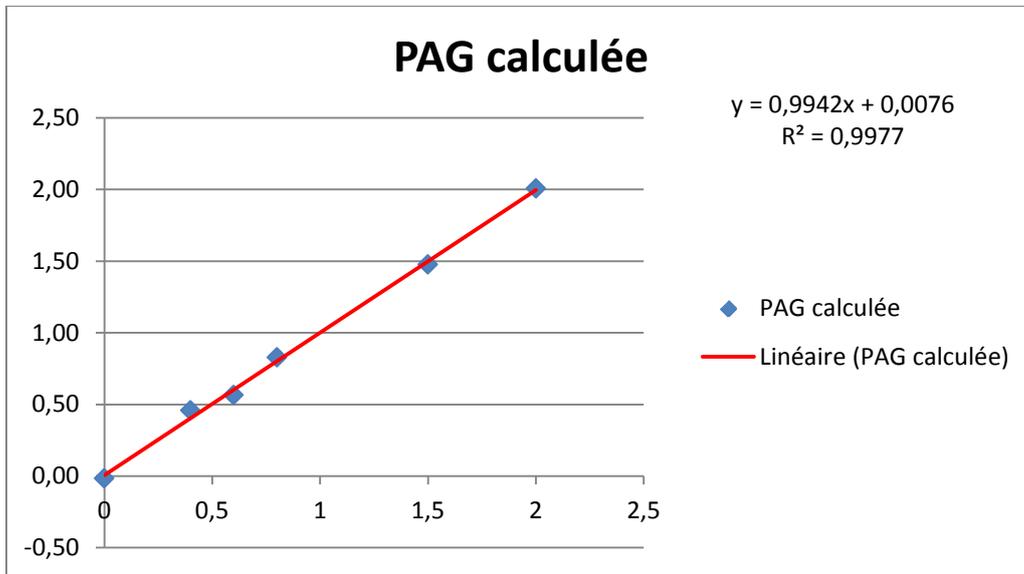


Figure n° 8: courbe de régression résultante des concentrations standards en fonctions de leurs absorbances moyennes correspondantes.

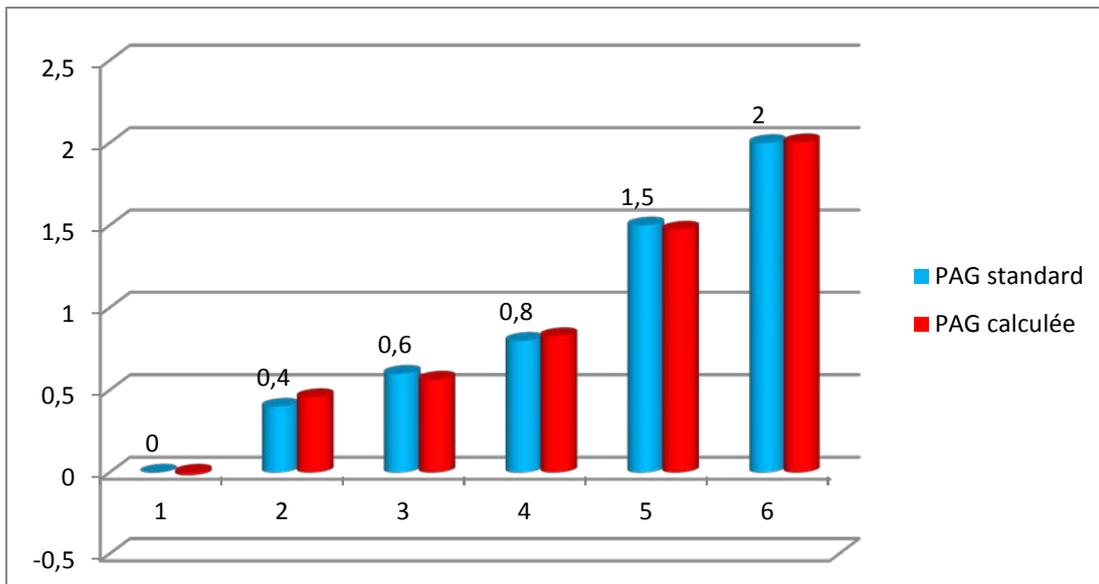


Figure n° 9: comparaison des concentrations standards données (en bleu) avec leurs concentrations correspondantes calculées (en rouge).

La reproductibilité de la méthode est estimée par le calcul des coefficients de variation intra- et inter-assays dont leurs valeurs respectives sont représentées dans le tableau n° 4.

Tableau n° 4: valeurs des coefficients de variations intra et inter-assay.

Numéro du prélèvement	Variation intra-assay		Variation inter-assay	
	PAG (ng/ml)	CV (%)	PAG (ng/ml)	CV (%)
01	2,21 ± 0,06	2,71 %	2,33 ± 0,14	6,01 %
02	1,67 ± 0,04	2,4 %	0,94 ± 0,12	12,8 %

Les taux de récupération de PAG dans l'échantillon résultant de mélange de deux sérums différents sont résumés dans le tableau n°5.

Tableau n°5: les taux de récupération de PAG par le kit ELISA-PAG.

Sérums (ng/ml)	1,70	1,03	Valeur prévue	Valeur observée	Récupération
	<i>100</i>	<i>100</i>	1,365	1,36	99,6%
Volumes additionnés	<i>100</i>	<i>200</i>	1,25	1,21	96,8%
(μ l)	<i>100</i>	<i>300</i>	1,20	1,14	95%
	<i>100</i>	<i>400</i>	1,16	1,10	94,8%

En ce qui concerne la spécificité, nous avons testé différentes molécules à savoir : PMSG, GnRH, Progestérone, Testostérone, Ocytocine et Dinoprost. Aucune réaction croisée n'a été enregistrée dans toutes les dilutions utilisées (Tableau 6), excepté l'échantillon du mâle bovin (0,64 ng/ml).

Tableau n°6 : les concentrations en PAG obtenues pour le test de spécificité à l'égard des différentes dilutions des molécules utilisées.

Molécules	Dilutions	PAG (ng/ml)
PMSG	1	0
	1/100	00
	1/1000	0,04
	1/10000	00
GnRH	1	00
	1/100	00
	1/1000	00
	1/10000	00
Progestérone	1	0,04
	1/100	00
	1/1000	0,13
	1/10000	00
Testostérone	1	00
	1/100	00
	1/1000	00
	1/10000	00
Ocytocine	1	00
	1/100	0,05
	1/1000	0,09
	1/10000	00
PGF _{2α}	1	0,01
	1/100	00
	1/1000	00
	1/10000	0,10

Quant au test de parallélisme, les résultats des dilutions sérielles des deux échantillons utilisés (N° 1 et N° 2) sont représentés dans les figures 10 et 11 :

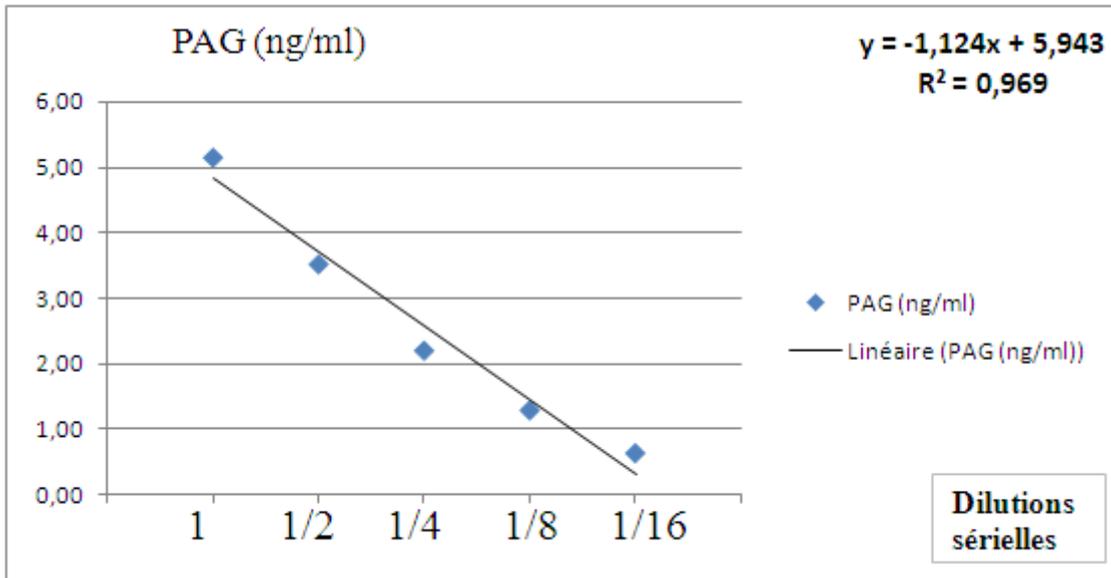


Figure n° 10 : représentation des concentrations en PAG correspondantes aux dilutions sérielles de l'échantillon N° 1 utilisé dans le test de parallélisme.

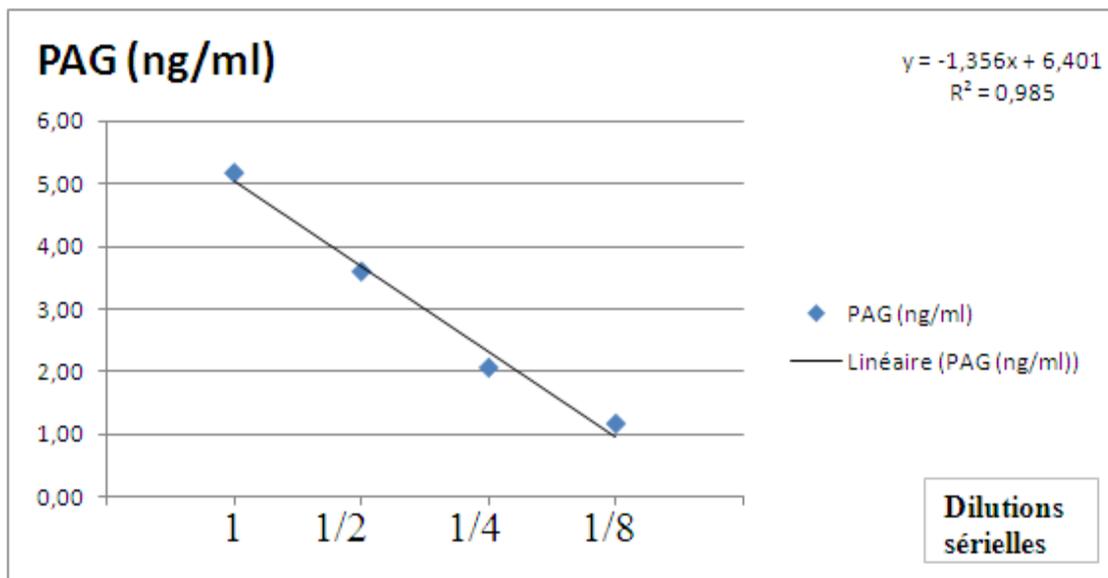


Figure n° 11 : représentation des concentrations en PAG correspondantes aux dilutions sérielles de l'échantillon N° 2 utilisé dans le test de parallélisme.

Par ailleurs, les résultats du test de conservation des échantillons à des températures différentes (-20° C, 37° C et à la température ambiante) n'ont pas révélé de différences significatives ($P > 0.05$). Excepté l'échantillon N° 3, conservé à -20° C et qui affichait une concentration de PAG inférieure (1,38 ng/ml) aux concentrations de ce même échantillon conservé différemment à 37° C ou à la température ambiante (figure 12).

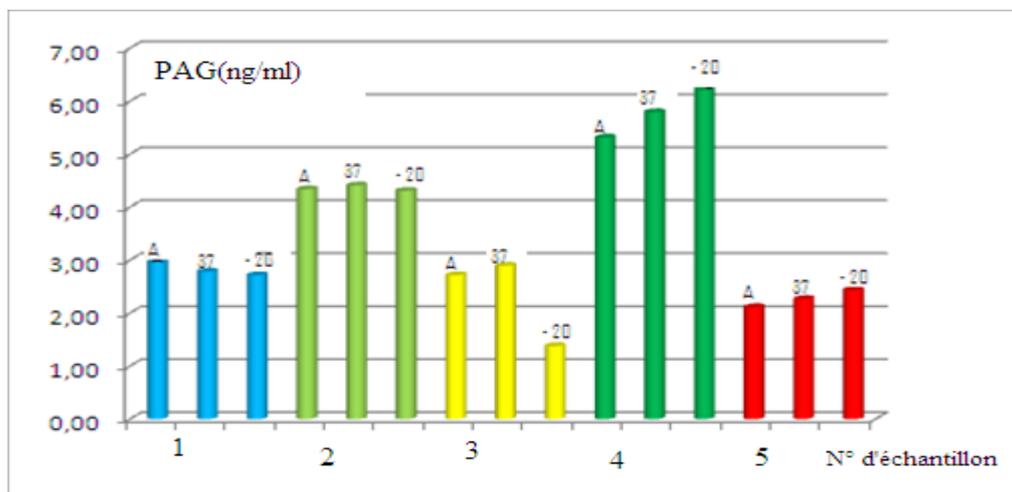


Figure n° 12: représentation des valeurs de PAG de cinq échantillons conservés chacun à des températures différentes (-20° C, 37° C et à la température ambiante qui avoisine 24° C).

II.2. paramètres de validation diagnostique

Les résultats des concentrations en PAG des 120 prélèvements constituant le groupe 1 ($n = 52$) et le groupe 2 ($n = 68$) ont été analysés et triés selon le seuil de positivité adapté (0,8 ng/ml) et les résultats obtenus par les méthodes de diagnostic de gestation utilisées comme référence (la palpation transrectale et l'échographie). En effet, on a obtenu 68 cas de vrais positifs, 15 cas de faux positifs, 37 cas de vrais négatifs et aucun cas de faux négatifs.

Tableau n° 7: répartition des 120 prélèvements en 04 groupes (vrais positifs: **A**, faux positifs: **B**, vrais négatifs: **C** et les faux négatifs: **D**).

vrai positif	faux positif	vrai négatif	faux négatif
A	B	C	D
68	15	37	00
TOTAL	120		

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la qualité de ce kit ELISA-PAG pour le diagnostic de gestation chez les bovins. Ce dogme ne peut être vérifié qu'en mesurant la sensibilité, la spécificité, l'exactitude positive, l'exactitude négative ainsi que l'exactitude globale de cette technique. Ces différents paramètres sont déduits à partir des taux et la nature (vrais ou faux) des cas positifs et négatifs obtenus par rapport aux méthodes standards utilisées. Dans cette étude, on a obtenu 100 % de sensibilité, 71,2 % de spécificité, 81,9 % d'exactitude positive, 100 % d'exactitude négative et 87,5 % d'exactitude globale.

Tableau n° 8 : Valeurs des paramètres de validation diagnostique du kit PAG– ELISA.

	Sensibilité	VPP	Spécificité	VPN	Précision
Résultats	100 %	81,9 %	71,2 %	100 %	87,5 %

II.3. Les concentrations de PAG obtenues des différents groupes

Selon le mode d'emploi du kit PAG– ELISA, les concentrations de PAG inférieures à 0,6 ng/ml signifient que les femelles ne sont pas gestantes. Les concentrations de PAG supérieures ou égales à 0,8 ng/ml signifient que les femelles sont gestantes. Tandis que les valeurs de PAG comprises entre 0,6 et 0,8 ng/ml donnent lieu à des résultats douteux. Dans notre étude, les valeurs de PAG comprises entre 0,6 et 0,8 ng/ml correspondaient à des échantillons issus de femelles qui sont avérées non gestante par échographie ou par palpation transrectale. Par conséquent, la concentration de 0,8 ng/ml a été justifiée et adaptée comme seuil de positivité (*Cut-off*) pour distinguer entre les femelles gestantes et non gestantes.

En analysant les concentrations de PAG du groupe 1 (n=52), nous avons enregistré 37 cas de vrais négatifs (71,2%) et 15 cas de faux positifs (28,8%) avec des concentrations moyennes de PAG de $0,53 \pm 0,18$ ng/ml et de $1,37 \pm 0,45$ ng/ml, respectivement. La concentration moyenne en PAG des femelles non gestantes (groupe 1), tous types confondus, est de $0,77 \pm 0,48$ ng/ml. En ce qui concerne le groupe 2 (n=68), nous avons obtenus 100% de cas vrais positifs. La concentration moyenne de PAG de femelles gestantes était de $3,5 \pm 1,17$ ng/ml.

L'évolution des concentrations de PAG mesurées sur une période allant de 25 à 50 jours post-IA du groupe 2 est représentée dans le tableau suivant :

Tableau n° 9: classement des sérums de groupe 2 selon la période de prélèvement.

Période (jours)	Nombre d'échantillons	Concentration moyenne PAG (\pm DS ng/ml)
[25 - 29]	14 (20,6 %) ^a	2,57 \pm 0,29 ^a
[30 - 35]	17 (25 %) ^a	3,65 \pm 0,26 ^b
[36 - 40]	23 (33,8 %) ^a	3,7 \pm 0,23 ^b
[41 - 50]	14 (20,6 %) ^a	3,98 \pm 0,29 ^b

Les différentes lettres indiquent une différence significative au seuil de $P < 0,05$.

Nous avons constaté que les concentrations sériques de PAG augmentent progressivement durant la période d'étude. Pendant la première période (25-29 post-IA), la concentration de PAG s'élève d'une manière significative ($2,57 \pm 1,28$ ng/ml) pour atteindre une valeur de $3,65 \pm 0,93$ ng/ml durant la période allant de 30 à 35 jours post-IA ($P < 0,05$). Ensuite, cette concentration augmente progressivement (non significative $P > 0,05$) de nouveau durant les périodes de 36-40 j et 41-50 j ($3,7 \pm 0,95$ ng/ml et $3,98 \pm 1,25$ ng/ml, respectivement).

Par ailleurs, une femelle (N° 36) a été prélevée six fois dans le but de suivre la cinétique de la PAG avant et après l'insémination artificielle (Figure 13).

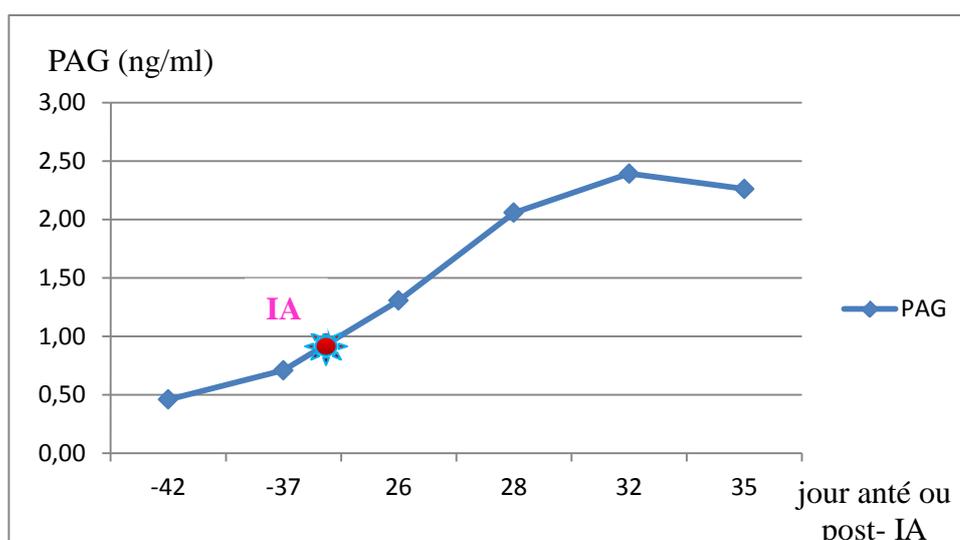


Figure n°13: représentation des concentrations de PAG mesurées chez la vache N° 36.

II-4. Comparaison des concentrations en PAG des génisses par rapport aux vaches

Les femelles bovines gestantes ont été réparties selon leur parité, soit 20,6 % de génisse et 79,4 % de vaches. Les concentrations moyennes de PAG de ces femelles sont représentées dans le tableau 10. En général, la concentration moyenne de PAG des génisses était significativement supérieure à celles des vaches ($p < 0,05$).

Tableau n° 10 : concentrations en PAG des femelles du groupe 2 (n=68) en fonction de leur parité (génisses, vaches) et le jour moyen de prélèvement.

	jour de prélèvement (moyenne \pm DS)	Concentration de PAG (ng/ml) (moyenne \pm DS)
Génisses (n=14)	32,93 \pm 1,55 ^a	4,1 \pm 0,30 ^a
Vaches (n=54)	35,5 \pm 0,79 ^a	3,36 \pm 0,16 ^b

Les différentes lettres indiquent une différence significative au seuil de $P < 0,05$.

III. Discussion

Le diagnostic de gestation constitue une étape obligée pour une meilleure maîtrise de la reproduction du cheptel bovin afin de réduire les périodes improductives et par conséquent, améliorer le rendement des élevages. Cette pratique essentielle est la clef pour pouvoir pronostiquer sur la qualité des paramètres et des performances de reproduction. Ceci justifie pleinement le recours aux différentes méthodes possibles de diagnostic de gestation chez la vache. C'est dans cette optique que nous avons envisagé de valider un nouveau kit ELISA pour le dosage de glycoprotéine associée à la gestation chez l'espèce bovine.

Les résultats obtenus concernant la reproductibilité, CV intra- et inter-assay, étaient très satisfaisant (2,4-2,71 % et 6,01-12,8 %, respectivement). Ces valeurs se rapprochent de celles rapportées par Green et collaborateurs (2005) en utilisant la technique immuno-enzymatique (ELISA) et qui varient respectivement de 3,70 % à 8,36 % et 5,69 % à 25,58 % pour l'intra et inter-assay. Et même, elles sont plus meilleures que celles obtenues par Friedrich *et* Holtz (2010) en utilisant la même technique et qui dépassent 13 % pour l'intra-assay et 16 % pour l'inter-assay. Concernant la spécificité, aucune réaction croisée n'a été observée à l'égard des différentes molécules testées. Ce constat confirme les résultats obtenus dans d'autres études de moins pour la Progestérone (Friedrich *et* Holtz, 2010) et la PMSG (Ayad *et al.*, 2007a ; Barbato *et al.*, 2009). D'autre part, une panoplie de molécules ont été déjà testées dans d'autres études à savoir : LH, FSH, eCG et AFP (Zoli *et al.*, 1992b) et hCG (Ayad *et al.*, 2007a). De même, des préparations d'hydrate de carbone ont été employées pour examiner la spécificité des RIA-PAG en l'occurrence : N-acétyle-D-galactosamine, N-acétyle-D-glucosamine, acide N-acétylneuraminique, monohydrate D(+)-lactose, D(+)-glucose, Méthylène-un-D-mannopyranoside, mannitol et D(+)-galactose (Ayad *et al.*, 2007a). Concernant le test de récupération, les taux varient de 94,8 % à 99,6 %. Ces résultats se rapprochent ou même meilleurs que ceux rapportés par Zoli et son équipe (1992b) (96% à 117%) ou ceux obtenus par Ayad *et al.* (2007a) (78,58 % à 108,12 %). Quant au parallélisme, les courbes des dilutions sérielles des sérums de femelles gestantes étaient parallèles dont le Coefficient de corrélation $R^2 = 0,97$ et $0,98$. Nous pouvons conclure que les tests réalisés dans la présente étude étaient très satisfaisants.

Conjointement, les résultats du test de conservation ont révélé que la PAG sérique est stable à des températures comprises entre -20° C et 37° C. Excepté un échantillon conservé à

-20°C qui a enregistré une valeur de PAG de 1,38 ng/ml, estimée la moitié de celle mesurée à 37°C et à la température ambiante. Cela pourrait être dû à des erreurs de manipulation. Par conséquent, à défaut de moyens de réfrigération, nous pouvons suggérer de transporter les échantillons de sérums à des températures ambiantes qui ne dépassent pas 37° C sans risque d'altérer leur concentration en PAG. Cependant, ce test a été effectué pendant 18 heures seulement et sur un nombre d'échantillon très réduit. En perspective, il serait très judicieux de réaliser le test de conservation sur une période plus longue et sur un échantillonnage plus large pour vérifier ces résultats.

L'intérêt majeur de toute méthode de diagnostic de gestation réside dans la différenciation précoce des femelles gestantes et de non gestantes (la sensibilité et la spécificité). Par ailleurs, il s'avère indispensable que son degré d'exactitude positive (VPP) soit maximal pour éviter l'allongement de la période improductive des femelles (faux positifs). De même, son degré d'exactitude négative (VPN) soit aussi maximal pour éviter une intervention thérapeutique malencontreuse de la gestation ou une réforme non souhaitée (faux négatifs). Dans notre étude, les résultats de diagnostic de gestation obtenus par le kit « ELISA-PAG » ont été évalués en comparaison avec les résultats ultérieurs d'échographie (35-40 post-IA) et de palpation transrectale (≥ 60 j post-IA). Cette évaluation est soldée par un taux de 28,8 % (15/52) de faux positifs et un taux nul de faux négatifs. D'après nos résultats, il paraît clair que si le risque de faire avorter des femelles gestantes ou de les reformer par erreur est nul, l'éventualité de l'allongement de l'intervalle vêlage-vêlage des vaches est d'autant plus marquant que le taux de faux positifs est important. Ce taux est dix fois plus conséquent que celui rapporté par Piechotta et collaborateurs (2010) qui est de 2,9 % de faux positifs en utilisant un kit ELISA-PSPB (BioPRYN[®]). Ce même auteur (Piechotta *et al.*, 2010) rapporte un taux de 8,8 % de faux positifs en utilisant un autre kit ELISA-PAG. Par ailleurs, Green et son équipe (2009) ont rapporté un taux similaire de 8,1 %. D'autres auteurs ont rapporté des résultats semblables allant de 5,8 % jusqu'à 10,4 % (Howard *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007). En revanche, le nombre de cas de faux négatifs était nul. Un résultat identique a été obtenu par Howard et al. (2007). D'autres auteurs ont avancé des résultats moins élevés allant de 0,2 % de faux négatifs (Green *et al.*, 2009), et parfois allant de 1,9 % à 4,6 % (Silva *et al.*, 2007; Piechotta *et al.*, 2010).

La sensibilité mesure la capacité de la méthode à diagnostiquer correctement les femelles gestantes, et la spécificité mesure la capacité de la méthode à diagnostiquer

correctement les femelles non gestantes. Dans notre travail, les résultats obtenus permet de dire que le kit ELISA-PAG utilisé est plus apte à détecter les femelles gestantes (sensibilité : 100 %) que non gestantes (spécificité : 71,2 %).

La sensibilité de la méthode est très satisfaisante et par ailleurs comparable à celles d'autres études réalisées par la technique ELISA allant de 97,8 % à 100 % (Howard *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2009; Piechotta *et al.*, 2010) et même meilleure que celle rapportée par d'autres auteurs allant de 93,9 % à 95,4 % (Gabor *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007; Romano *et Larson*, 2010). De même, elle est comparable à celles rapportées dans d'autres études utilisant la technique radio-immunologique (RIA-PAG) allant de 98,9 % à 100 % (Zoli *et al.*, 1992a; Skinner *et al.*, 1996; Ayad *et al.*, 2007a) et même meilleure que celle rapportée par d'autres auteurs: 94,3 % et 95,1 % (Szenci *et al.*, 1998; Garmo *et al.*, 2008).

Quant à la spécificité, bien qu'elle n'est pas très loin de celle enregistrée par Zoli et son équipe (1992a) et Howard et collaborateurs (2007) (87,5 % et 87,8 %, respectivement) et même similaire à celle rapportée par Szenci et al. (1998) (71,3 %) et relativement meilleure que celle éditée par Gabor et collaborateurs (2004) (Sp : 68,6 %), ce résultat est néanmoins beaucoup plus inférieur que ceux obtenus dans d'autres études allant de 91,9 % à 100 % (Ayad *et al.*, 2007a; Silva *et al.*, 2007; Garmo *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2009; Piechotta *et al.*, 2010; Romano *et Larson*, 2010).

En ce qui concerne l'exactitude des diagnostics positifs, malgré que la valeur obtenue était comprise dans la fourchette enregistrée par Ayad et collaborateurs (2007a) (75,5 % à 100 %) en utilisant différents systèmes RIA-PAG, elle est néanmoins beaucoup moins meilleure que celle rapportée par plusieurs auteurs (Zoli *et al.*, 1992a; Skinner *et al.*, 1996; Green *et al.*, 2009; Piechotta *et al.*, 2010; Romano *et Larson*, 2010). Toutefois, cette valeur prédictive positive ressortie dans notre étude se rapproche de celles rapportées par Howard et collaborateurs (2007) et Silva et al. (2007) (89,6 %, 90,7 %, respectivement) et même meilleure que celle rapportée par Szenci et collaborateurs (1998) (73,8 %). Par contre, l'exactitude des diagnostics négatifs était parfaite (100%), comparable ainsi à celles rapportées par les études précédentes (Skinner *et al.*, 1996; Ayad *et al.*, 2007a; Howard *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, 120 sérums issus de femelles bovines gestantes (25-50 post-IA) et non gestantes ont été utilisés pour calculer l'exactitude totale (précision) du kit ELISA-

PAG, le résultat obtenu de la technique immunologique était de 87,5 %. Cette exactitude est similaire à celle rapportée dans une étude utilisant une méthode qualitative ELISA-PAG (87,7%) sur des prélèvements collectés à partir de 35 jours post-IA (Green *et al.*, 2009). Mais elle est beaucoup plus faible (95,9 %-97,6 %) que celle avancée par ce même auteur (Green et collaborateurs, 2009) entre 25 à 34 jours post-insémination et par d'autres allant de 96,4 % à 100 % (Skinner *et al.*, 1996 ; Howard *et al.*, 2007 ; Silva *et al.*, 2007 ; Piechotta *et al.*, 2010 ; Romano et Larson, 2010).

En ce qui concerne les concentrations en PAG des femelles gestantes (groupe 2), elles varient de 0,98 ng/ml à 6,21 ng/ml avec une moyenne de $3,5 \pm 1,17$ ng/ml. Nous constatons que la concentration de PAG ne cesse d'augmenter. En effet, elle passe de $2,57 \pm 1,28$ ng/ml à $3,65 \pm 0,93$ ng/ml d'une période de prélèvement à une autre (25-29 et 30-35 j post-IA, respectivement) marquant un bond de 42 %. Puis elle augmente légèrement à $3,7 \pm 0,95$ ng/ml durant la période 36-40 jours post-IA. En fin, elle augmente davantage pour atteindre un taux de $3,98 \pm 1,25$ ng/ml entre 41 à 50 jours post-insémination. Cette augmentation de 42 % entre les deux premières périodes pourrait être expliquée par les premières migrations en masse des cellules binucléées qui s'opèrent dès le début de l'implantation, déversant ainsi leurs contenus vacuolaires, riche en molécules placentaires, en particulier les PAGs dans la circulation maternelle. Chez la vache, le processus de l'implantation débute dès le 19^e jour post-fécondation (King *et al.*, 1982), chose confirmée indirectement par les nouvelles études portant sur la détection des PAGs sériques. En effet selon Perenyi et collaborateurs (2002a), les concentrations de PAG sont détectables au plus tôt à partir des 19^e – 22^e jours après conception permettant ainsi la tolérance maternelle de la greffe embryonnaire (Roberts *et al.*, 1996). Le phénomène de l'implantation s'achève au environ de 27^e au 30^e jour post-fécondation (King *et al.*, 1982). Par ailleurs, au-delà de 35 jours, l'évolution faible des concentrations en PAG pourrait être expliquée par le temps nécessaire pour l'apparition des nouvelles générations de cellules binucléées. En somme, La cinétique des concentrations de PAG sérique obtenue dans la présente étude était forte proche de celle rapportée dans la littérature (Zoli *et al.*, 1992b; Szenci *et al.*, 2000).

Les concentrations moyennes de PAG des génisses et des vaches correspondent respectivement à $4,1 \pm 0,30$ ng/ml au environ de 33 jour post-IA et $3,36 \pm 0,16$ ng/ml au environ de 36 jour post-IA. On constate que la concentration moyenne de PAG chez les génisses est supérieure à celle des vaches malgré que le jour moyen de prélèvement soit plus tardif chez ces dernières et certainement, elles ont besoins plus de temps encore pour atteindre

la concentration de PAG des nullipares. Les résultats obtenus dans cette étude sont avérés en concordance avec les conclusions tirées par Zoli et collaborateurs (1992b) dont il confirme que les concentrations sériques de PAG sont plus élevées chez les génisses que chez les vaches Holstein. Quoique, dans la présente étude les femelles bovines prélevées appartiennent à des races différentes alors que la littérature confirme que le facteur race influence sensiblement la cinétique de sécrétion de la PAG. D'ailleurs, Zoli et son équipe (1992b) ont rapporté que les concentrations moyennes de PAG pendant la période périnatale sont plus élevées chez les vaches Hereford que chez les génisses et les vaches Holstein. Ce résultat inversé ne pourrait être expliqué que par la masse placentaire probablement plus importante chez la race Hereford que chez la race Holstein. Par ailleurs, des résultats opposés à ceux obtenus dans notre étude ont été rapportés par Ayad et al (2009) dont il confirme que les concentrations moyennes de PAG des génisses Holstein sont nettement inférieures à celles des primipares et des multipares Holstein.

Conclusion

L'objectif de cette étude était la validation d'une technique immuno-enzymologique pour le dosage de protéine associées à la gestation. L'approbation de cette technique ELISA-PAG, conçue pour le diagnostic de gestation chez la vache, passe inéluctablement par la vérification des paramètres de dosage (la reproductibilité, la spécificité, la récupération et le parallélisme), ainsi que la détermination des paramètres de diagnostic de cette méthode (la sensibilité, la spécificité, les VPP, les VPN et l'exactitude totale). En outre, un autre test a été envisagé pour vérifier la sensibilité de cette protéine (PAG) aux températures de conservation. A cet effet:

- Le CV intra- et inter-assay varie de 2,4 à 2,71 % et de 6,01 à 12,8 %, respectivement.
- Aucune réaction croisée n'a été enregistrée dans toutes les dilutions des molécules utilisées à savoir : PMSG, GnRH, Progestérone, Testostérone, Ocytocine et Dinoprost.
- La concentration en PAG chez le mâle était de 0,64 ng/ml.
- Le taux de récupération varie de 94,8 à 99,6 %.
- Les courbes des dilutions sérielles étaient parallèles dont le Coefficient de détermination $R^2 = 0,97$ et $0,98$.
- La PAG sérique est stable à des températures comprises entre -20°C et 37°C .
- La sensibilité et la spécificité étaient respectivement 100 % et 71,2 %.
- Les VPP et les VPN étaient respectivement 81,9 % et 100 %.
- L'exactitude totale de la cette technique était de 87,5 %.
- Les concentrations de PAG chez les femelles gestantes varient de 0,98 ng/ml à 6,21 ng/ml ($3,5 \pm 1,17$ ng/ml).
- La concentration moyenne de PAG chez les femelles non gestantes était de $0,77 \pm 0,48$ ng/ml.
- La concentration moyenne en PAG des génisses est supérieure à celle des vaches.

Nous pouvons conclure que les tests réalisés sur les paramètres de dosage dans la présente étude étaient très satisfaisants. Par ailleurs, cette technique offre une sensibilité et des VPN très élevées (100 %). Ce qui nous permet de dire que toutes les femelles réellement gestantes ne peuvent être diagnostiquées que positives par cette technique (ELISA-PAG). De ce fait, le risque de réforme ou de l'avortement par erreur d'une femelle pleine est quasiment écarté. En outre, cette technique apparaît très précoce car elle arrive à diagnostiquer les femelle gestantes

même à 25 jours post-insémination. En revanche, hormis la précision qui est assez satisfaisante, les VPP et la spécificité sont relativement peu concluantes. En effet, si les résultats de ce kit peuvent être considérés comme indiscutables lors de négativité, il offre néanmoins 28,8 % de faux positifs. Mais tout de même, il paraît clair que les diagnostics faux positifs coûtent beaucoup moins chers que les diagnostics faux négatifs.

En perspective, davantage que le diagnostic précoce de gestation et étant donné sa sensibilité fort élevée, cette technique (ELISA-PAG) offre la possibilité de quantifier d'une manière plus précise l'incidence et la chronologie de la mortalité embryonnaire chez les bovins lors de dosage répété de la PAG, mieux encore s'il est épaulé par des dosages de progestérone. De même, il serait très intéressant d'investiguer sur l'utilisation de cette technique sur d'autres espèces (ovins et caprins). Par ailleurs, compte tenu de sa spécificité peu élevée, l'objectif primordial dans l'avenir est de penser à tester d'autres molécules qui peuvent avoir une réaction croisée avec l'anticorps de capture utilisé et de ce fait, de comprendre, au moins en partie, l'énigme des résultats faux positifs. Mieux encore, c'est d'envisager l'amélioration de la purification des extraits placentaires utilisés pour la synthèse de l'antisérum pour éliminer davantage les protéines contaminantes.

Références bibliographiques

1. AILENBERG M et SHEMESH M. Partial purification of a chorionic gonadotropin-like protein from bovine cotyledons. *Biol. Reprod.* 1983; 28: 517-522.
2. AYAD A., SOUSA N.M., SULON J., HORNICK J.L., IGUER-OUADA M et BECKERS J.F. correlation of five radioimmunoassay systems for measurement of bovine plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations at early pregnancy period. *Research in Veterinary Science* 86 (2009), 377 – 382.
3. AYAD A., SOUSA N.M., SULON J., HORNICK J.L., WATTS J., LOPEZ-GATIUS F., IGUER-OUADA M et BECKERS J.F. Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 2007b, 67, 1503-1511.
4. AYAD A., SOUSA N.M., SULON J., IGUER-OUADA M et BECKERS J.F. Comparison of five radioimmunoassay systems for PAG measurement : ability to detect early pregnancy in cows. *Repro Dom Anim*, 2007a, 42, 433 – 440.
5. BARBATO O., MERLO M., CELI P., SOUSA N.M., GUARNERI L., BECKERS J.F. Relationship between plasma progesterone and pregnancy-associated glycoprotein concentrations during early pregnancy in dairy cows. *The veterinary journal*, 2013, 195, 385-387.
6. BARBATO O., SOUSA N.M., DEBENEDETTI A., CANALI C., TODINI L et BECKERS J.F. Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology*. 2009, 72, 993 – 1000.
7. BECKERS J.F., DEWULF M., VERSTEGEN J., WOUTERS-BALLMAN P et ECTORS F. Isolation of a bovine chorionic gonadotrophin (bCG). *Theriogenology*, 1988; 29: 218.
8. BETTERIDGE K.J., EAGLESOME M.D., RANDALL G.C.B et MITCHELL D. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. *J. reprod. Fert.*, 1980, 59: 205-216.
9. BOHN H. Immunochemical identification of human pregnancy proteins. *Arch. Gynäk.*, 1974, 217: 219-231.
10. BOSHIER D et HOLLOWAY H. The sheep trophoblast and placental function: an ultrastructural study. *J. Anat.*, 1977, 124: 287-298.

11. BOSHER D. A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 1969, 19, 51-61.
12. BREUKELMAN S.P., PEREGNYI Z.S., DE RUIGH L., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW A.M., JONKER F.H., VERNOOIJ J.C.M., BECKERS J.F., VAN DER WEIDJEN G.C., VOS PLAM., DIELEMAN S.J et TAVERNE M.A. Plasma concentrations of bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG) do not differ during the first 119 days between ongoing pregnancies derived by transfer of in vivo and in vitro produced embryos. *Theriogenology*, 2005b, 63, 1378-1389.
13. BREUKELMAN S.P., SZENCI O., BECKERS J.F., KINDAHL H., MULDER E.J., JONKER F.H., VAN DER WEIDJEN B., REVY D., POGANY K., SULON J., NEMEDI I et TAVERNE M.A. Ulyrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and prostaglandin F2 alpha-metabolite (PGF2alpha-metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. *Theriogenology*, 2005a, 64, 917-933.
14. BULTER J.E., HAMILTON W.C., SASSER R.G., RUDER C.A., HASS G.M et WILLIAMS R.J. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.*, 1982, 26: 925 – 933.
15. CAMOUS S., CHARPIGNY G., GUILLOMOT M., MARTAL J et SASSER R.G. Purification of one bovine pregnancy-specific protein by high performance liquid chromatography (HPLC). 1988.
16. CHAVATTE-PALMERP., DE SOUSA N.M., LAIGRE P., CAMOUS S., PONTER A.A et BECKERS J.F. Ultrasound fetal measurements and pregnancy-associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying clones. *Theriogenology*, 2006, 66, 829-840.
17. CHEN X, ROSENFELD C.S, ROBERTS R.M et GREEN J. An aspartic proteinase expressed in the yolk sac and neonatal stomach of the mouse. *Biol. Reprod.*, 2001, 65, 1092-1101.
18. CLERGET A., SOUSA N.M., BELLA A., MAGHUIN-ROGISTER et BECKERS J.F. Les glycoprotéines placentaires chez les mammifères. (placental glycoproteins in the mammals). *Annales d'Endocrinologie* 69 (2008) 18 – 29.
19. DEL VECCHIO R.P., SUTHERLAND W.D et SASSER R.G. Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E2, oxytocin and progesterone I response to

- pregnancy-specific protein B and prostaglandin F2 α . *J. Reprod. Fertil.*, 1996, 107, 131-136.
20. DERIVAUX J et ECTORS F. Physiologie de la gestation et obstétrique vétérinaire. *Edition du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort*, 1980.
21. DOBSON H., ROWAN T.G., KIPPAX I.S et HUMBLLOT P. Assessment of fetal number, and fetal placental variability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1993, 40, 411-425.
22. DOSOGNE H., MASSART-LEEN et BURVENIC H C. Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2000, 480, 295-305.
23. EL AMIRI B. Investigations sur les glycoprotéines associées à la gestation (PAGs) chez la brebis : isolement, purification et caractérisation. *Thèse*. 2003. 155p.
24. FRIEDRICH M et HOLTZ W. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reprod Dom Anim*, 2010, 45, 142-146.
25. GABOR G., TOTH F., SASSER G., SZASZ., BARANY I., WOLFLING A et VOLGYI-CSIK J. Ways of decrease the period between calving in dairy cows. Early pregnancy detection by *BioPRYN* ELISA-test. 2004, 126, 459-464.
26. GAJEWSKI Z., DE SOUSA N.M., BECKERS J.F., PAWLINSKI B., OLSZEWSKA M., THUN R et KLECZKOVSKI M. Concentration of bovine pregnancy-associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows. *Journal of physiology and pharmacology*, 2008, 59, 55-64.
27. GAN X, XIE S et ROBERTS R.M. Identification of transcripts for pregnancy-associated glucoprotein (PAG) in carnivora and perissodactyla (abstract). *Biol. Reprod.*, 1997, 56, 431.
28. GARBAYO J.M., REMY B., ALABART J.L., FOLCH J., WATTIEZ R et BECKERS J.F. Isolation and characterization of a caprine pregnancy-associated glycoprotein (cPAG). *Biol Reprod*, 1997, 56; 89.
29. GARMO R.T., REFSDAL F., KARLBERG K., ROPSTAD E., WALDMANN A., BECKERS J.F et REKSEN O. Pregnancy incidence in Norwegian red cows using nonreturn to estrus, rectal palpation, pregnancy-associated glycoproteins, and progesterone. *J. dairy sci.* 2008, 91: 3025 – 3033.
30. GILTILIN D et BOESMEN M. Sites of a serum alpha-foetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J. Clin. Invest.*, 1967, 46, 1010.
-

31. GOGOLIN-EWENS K.J., LEE C.S., MERCER W.R., MOSEBY A.M et BRANDON M.R. Characterization of a sheep trophoblast-derived antigen first appearing at implantation. *Placenta*, 1986, 7: 243-255.
32. GONZALEZ F., SULON J., CALERO P., BATISTA A., GRACIA A et BECKERS J.F. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats. *Theriogenology*, 2001, 56, 671-676.
33. GREEN J.A, XIE S, SZAFRANSKA B, GAN X, NEWMAN A.G, MCDOWELL K et ROBERTS R.M. Identification of a new proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta. *Biol. Reprod.*, 1999, 60, 1069-1077.
34. GREEN J.A., PARKS T.E., AVALLE M.P., TELUGU B.P., McLAIN A.L., PETERSON A.J., McMILLAN W., MATHIALAGAN N., HOOK R.P., XIE S et ROBERTS R.M. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology* 63 (2005) 1481 – 1503.
35. GREEN J.A., XIE S., QUAN X., BAO B., GAN X., MATHIALAGAN N., BECKERS J.F et ROBERTS R.M. pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2000, 62: 1624-1631.
36. GREEN J.C., VOLKMANN D.H., POOCK S.E., McGRATH M.F., EHRHARDT M., MOSELEY A.E et LUCY M.C. Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle. *J. Dairy Sci.* 2009, 92: 3819 – 3824.
37. GUILBAULT L.A., BECKERS J.F., LAPIERRE F., ZOLI A.P., BENITER-ORTIZ W et ROY G.L. Peripartum concentrations of placental protein hormones (hPL and bPAG) in Holstein and Hereford recipients carrying purebred Holstein fetuses (Abstract). *Theriogenology*, 1991, 35, 208.
38. GUILLOMOT M. L'implantation du blastocyste. In : Thibault C., Levasseur M.C. (Eds), la reproduction chez les mammifères et l'homme. 2^e Ed. *Ellipses : Paris*, 2001, 457 – 478.
39. HOEBEN D., MONFARDINI E., OPSOMER G., BURVENICH C., DOSOGNE H., DE KRUIF A et BECKERS J.F. Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leukocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *J. Dairy. Res.*, 2000, 67, 249-259.
40. HOWARD J., GABOR G., GRAY T., PASSAVANT C., AHMADZADEH A., SASSER N., PALS D et SASSER G. BIOPRYN, a blood-based pregnancy test for managing

- breeding and pregnancy in cattle. *Proceedings, Western Section, American Society of animal science*, Vol. 58, 2007.
41. HUANG F., COCKRELL D.C., STEPHENSON T.R., NOYES J.H et SASSER R.G. Isolation, purification and characterisation of pregnancy-specific protein B from elk and mouse placenta. *Biol Reprod*, 1999; 61: 1056-1061.
42. KAREN A., BECKERS J.F., SULON J., SOUSA N.M., SZABADOS K., RECZIGEL J et SZENCI O. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology*, 2003, 59, 1941-1948.
43. KASTELIC J.P. Critical evaluation of scientific articles and other sources of information: an introduction to evidence-based veterinary medicine. *Theriogenology*, 2006.
44. KING G.J., ATKINSON B.A et ROBERTSON H.A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. *J.reprod.fert.*, 1982, (suppl.31), 17-30.
45. KIRACOFÉ G.H., WRIGHT J.M., SCHALLES R.R., RUDER C. A., PARISH S et SASSER R.G. Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 1993, 71: 2199 – 2205.
46. LOPEZ-GATIUS F., GARBAYO J.M., SANTOLARIA P., YANIZ J., ALMERIA S., AYAD A., SOUSA N.M et BECKERS J.F. Cross-breed pregnancies were associated with higher plasmatic pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration throughout gestation in *Neospora*-seropositive dairy cows. *Theriogenology*, 2007b, 67, 502-508.
47. LOPEZ-GATIUS F., GARBAYO J.M., SANTOLARIA P., YANIZ J., AYAD A., SOUSA N.M et BECKERS J.F. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2007a, 32, 29-42.
48. LOPEZ-GATIUS F., HUNTER R.H., GARBAYO J.M., SANTOLARIA P., YANIZ J., SERRANO B. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high producing dairy cows suffering early fetal loss during the warm season. *Theriogenology*, 2007c, 67, 1324-1330.
49. LYNCH K.A., ALEXANDER R.M et SASSER R.G. The cloning expression of the bovine pregnancy-specific protein B (bPSPSB) gene. *Biol, Reprod.*, 1992, 46, 73.
50. METELO R., SILVA S., BECKERS J.F., MOREIRA D.A et SILVA F. Determination of pregnancy-associated glycoprotein (bPAG) in cow's milk. 2004.

51. METELO R., SULON J., MOREIRA DA SILVA F et CKERS J.F. Preliminary results for measuring bovine PAG in milk samples. *In: 7^{ème} journée de rencontre Bioforum, Bioliège, Association des biotechnologistes liégeois, Liège, 3 mai 2002, 32.*
52. MIALON M.M., CAMOUS S., RENAND G., MARTAL J et MENISSIER F. Peripheral concentrations of a 60-KDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1993, 33, 269 – 282.
53. MOREIRA DA SILVA F., BURVENICH C., PAAPE M.J., BECKERS J.F et LEEN A.M. Effect of cortisol, estradiol, progesterone and pregnancy-associated glycoprotein on oxidative burst (OB) activity bovine neutrophils (PMN). *Society for Leukocyte Biology: Bethesda*, 1997, 214.
54. PATEL O.V., SULON J., BECKERS J.F., TAKAHASHI T., HIPAKO M., SASAKI N et DOMEKI I. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations through gestation in relationship fetal number in the cow. *Eur. J. Endocrin.*, 1997, 137, 423-428.
55. PERENYI Z. Investigations on pregnancy-associated glycoproteins in the cow. *These*. 2002b. 147p
56. PERENYI Z., SZENCI O., SULON J., DRION P.V et BECKERS J.F. Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Reprod. Domest. Anim.*, 2002a, 37: 100 – 104.
57. PIECHOTTA M., BOLLWEIN J., FRIEDRICH M., HEILKENBRINKER T., PASSAVANT C., BRANEN J., SASSER G., HEODEMAKER M et BOLLWEIN H. Comparison of commercial ELISA blood tests for early pregnancy detection in dairy cows. 2010.
58. REIMERS T.J., SASSER R.G et RUDER C.A. production of pregnancy-specific protein by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.*, 1985, 32 (suppl. 1), 55.
59. ROBERTS R.M., XIE S et MATHIALAGAN N. Maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 1996, 54, 294-302.
60. RODBARD D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin Chem.*, 1974, 20, 1255-1270.
61. ROMANO J.E et LARSON J.E. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology*; 2010, 74, 932-939.
62. SASSER R.G., CROCK J et RUDER C.A. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, 37, 109-113.

63. SASSER R.G., RUDER C.A., IVANI K.A., BULTER J.E et HAMILTON W.C. Detection of pregnancy radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profil of serum concentration during gestation. *Biol. Reprod.*, 1986, 35, 936 – 942.
64. SEMAMBO D.K.N., ECKERSALL P.D., SASSER R.G et AYLIFFE T.R. Pregnancy specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology*, 1992, 37, 741-748.
65. SILVA E., STERRY R.A., KOLB D., MATHIALAGAN N., McGRATH M.F., BALLAM J.M et FRICKE P.M. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 2007, 90: 4612 – 4622.
66. SKINNER J.G., GRAY D., GEBBIE F.E., BECKERS J.F et SULON J. Field evaluation of pregnancy diagnosis using bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG). 1996, 281 – 284.
67. SOUSA N.M., EL AMIRI B., SULON J et BECKERS J.F. Dosages réalisables pour le diagnostic de gestation. *SFB. Paris*, 29, 30, 31 oct. 2002, P 137.
68. SOUSA N.M., REMY B., EL AMIRI B., BANGA-MBOKO H., FIGUEIREDO J.R., GONCALVES P.B.D., WATTIEZ R., DODE M.A.N., FALMAGNE P et BECKERS J.F. Isolation of the pregnancy-associated glycoprotein 1 (PAG-1) from zebu (*Bos indicus*) placenta. 2000.
69. SZAFRANSKA B, XIE S, GREEN J et ROBERTS R.M. Porcine pregnancy-associated glycoproteins ; new members of the aspartic proteinases gene family expressed in the trophoctoderm. *Biol. Reprod.*, 1995, 53, 21-28.
70. SZENCI O. Recent possibilities for the diagnosis of pregnancy and embryonic mortality in the cow. 2006.
71. SZENCI O., BECKERS J.F., HUMBLOT P., SULON J., SASSER G., TAVERNE M.A.M., VARGA J., BALTUSEN R et SCHEKK G.Y. Comparison of ultrasonography bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 1998. 50.77 – 88.
72. SZENCI O., HUMBLOT P., BECKERS J.F., SASSER G., SULON J., BALTUSEN R VARGA J., BAJCSY CS.A et TAVERNE M.A.M. Plasma profiles of progesterone and conceptus proteins in cows with spontaneous embryonic /fetal mortality as diagnosed by ultrasonography. *The Veterinary Journal* 2000, 159, 287-290.

73. TAINTURIER D. BEDEL M., BECKERS J.F., FIENI et BRUYAS J.F. Cinétique de la bPAG (bovine pregnancy associated glycoprotein) dans le plasma et dans le lait au cours des trois semaines suivant le part chez la vache laitière. *Repro Prod Laitière* 1996, 129-133.
74. TATARINOV Y.S et MASYUKEVICH V.N. Immunochemical identification of new betal globulin in blood serum of pregnancy women. *Biull Eksp. Biol. Med.* 1970, 69: 66-68.
75. TATARINOV Y.S, KRIVONOSOV S.K, PETRUNIN D.D et SHEVCHENKO O.P. Comparative immunochemical analysis of specific β -globulins of "pregnancy zone" in human and mammals. *Byull. Eksp; Biol. Med.* 1976, 10: 1123-1125.
76. WEEMS Y.S., LAMMOGLIA M.A., VERA-AVILA H.R., RANDEL R.D., KING C., SASSER R.G et WEEMS C.W. Effect of luteinizing hormone (LH), PAG E2, 8-EPI-PGE1, 8-EPI-PGE2, trichosantinn and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of progesterone *in vitro* by corpora lutea (CL) from nonpregnant cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 1998, 55, 27-42.
77. WILLARD J.M., WHITE D.R., WESSON C.A.R., STELFLUG J et SASSER R.G. Detection of fetal twins in sheep using radioimmunoassay for pregnancy-specific protein B. *J. Anim.Sci.*, 1995, 73: 960-966.
78. WOODING F.B., ROBERTS R.M et GREEN J.A. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implication. *Placenta*, 2005; 26: 807-827.
79. WOODING F.B.P et BECKERS J.F. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell Tissue Res.*, 1987, 247, 667-673.
80. WOODING F.B.P et WATHES D.C Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fert.*, 1980, 59: 425-430.
81. WOODING F.B.P, MORGAN G., MONAGHAN S., HAMON M et HEAPR.P. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells different selective synthetic capacity placenta, 1996, 17, 75-86.
82. WOODING F.B.P. current topic: The synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, 1992, 13: 101-113.
83. WOODING F.B.P. Role of binucleate cells I fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am. J. Anat.*, 1984, 170, 233-250.

84. XIE S., GREEN J., BAO B., BECKERS J.F., VALDEZ K.E., HAKAMI L et ROBERTS R.M. Multiple pregnancy-associated glycoprotein are secreted by day 100 ovine placental tissue. *Biol Reprod*, 1997; 57: 1384-1393.
85. XIE S., LOW B.G., NAGEL R.J., BECKERS J.F et ROBERTS R.M. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm. *Biol. Reprod.* 1994; 51: 1145-1153.
86. XIE S., LOW B.G., NAGEL R.J., KRAMER K.K., ANTHONY R.V., ZOLI A.P., BECKERS J.F et ROBERTS R.M. identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 1991, 88: 10247 – 10251.
87. ZARROUK A., ENGELAND I., SULON J et BECKERS J.F. Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondii* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study. *Theriogenology*, 1999, 52, 1105-1114.
88. ZOLI A.P., BECKERS J.F., BENITEZ-ORTIZ W et ECTORS F. Isolement, purification et caractérisation d'une protéine placentaire associée à la gestation chez les bovins. *Thèse de doctorat, Université de Liège.*, 1992b, 166 p.
89. ZOLI A.P., BECKERS J.F., WOUTERS-BALLMAN P., CLOSSET J., FALMAGNE P et ECTORS F. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 1991, 45, 1 – 10.
90. ZOLI A.P., GUILBAULT L.A., DELAHAUT P., BENITEZ ORTIZ W et BECKERS J.F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Boil. Reprod.*, 1992a, 46, 83 – 92.

Résumé

L'objectif de cette étude était la validation d'une technique immuno-enzymologique (ELISA) et le dosage de PAG pour le diagnostic précoce de la gestation chez la vache. Au total 120 prélèvements ont été effectués à partir des veines coccygiennes des bovins de races différentes. 52 échantillons constituent le groupe des femelles non gestantes, et 68 échantillons issus de femelles (25-50 J post-IA) confirmées gestantes par échographie ou palpation transrectale. Les concentrations sériques de PAG ont été déterminées par la technique ELISA sandwich directe (EIA PAG (E.G.7), CER Groupe). Les coefficients de variations (CV) intra- et inter-assay obtenus étaient respectivement 2,4-2,71 %, et 6,01-12,8%. Les dilutions sérielles étaient parallèles ($R^2=0,98$). Les résultats du test de récupération étaient très satisfaisant (94,8-99,6 %). Quant à la spécificité, aucune réaction croisée n'a été enregistrée à l'égard des molécules testées. Les concentrations moyennes de PAG des femelles gestantes et non gestantes étaient respectivement $3,5 \pm 1,17$ ng/ml et $0,77 \pm 0,48$ ng/ml. Les résultats de sensibilité et valeurs prédictives négatives (VPN) de la technique immuno-enzymologique étaient de 100%. Par contre, la spécificité, les valeurs prédictives positives (VPP) ont enregistrées respectivement des valeurs 71,2 % et 81,9 %. Le pourcentage d'exactitude obtenu était satisfaisant (87,5%). A terme de cette expérimentation, nos résultats montrent clairement que le dosage de PAG sérique par la technique immuno-enzymologique pourrait être utilisé dans le diagnostic précoce de gestation chez la vache.

Mots clefs : Diagnostic, gestation, vache, PAG, ELISA.

Summary

The aim of this study was to validate a pregnancy-associated glycoprotein enzyme-immunoassay method for early pregnancy diagnosis in cows. Blood samples were collected in the coccygeal vein in females non-pregnant (n=52) and pregnant (n=68) between 25 to 50 days post-IA, diagnosed pregnant by ultrasonography or rectal palpation). Concentrations of PAG were assessed by spectrophotometer using direct ELISA sandwich (EIA PAG (E.G.7), CER Groupe). The intra- and inter-assay CV obtained were 2.4-2.71 % and 6.01-12.8 %, respectively. The results of accuracy (94.8-99.6%) and parallelism ($R^2=0.98$) were very satisfactory. Concerning the specificity, no cross-reaction was observed with different molecules tested. The PAG-ELISA method gave 100% sensitivity and negative predictive value (NPV). The Specificity and positive predictive value (PPV) were 71.2% and 81.9%, respectively. The mean PAG concentration in females non-pregnant was very lower (0.77 ± 0.48 ng/ml). For samples from pregnant females, the mean PAG concentration was higher (3.5 ± 1.17 ng/ml) than the threshold 0.8 ng/ml. The rate of accuracy obtained was satisfactory (87.5%). In conclusion, these results show clearly that PAG enzyme-immunoassay technique can be used to measure PAG in serum bovine for early pregnancy diagnosis in cows.

Key words: diagnosis, pregnancy, cow, PAG, ELISA.