

Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins

Sylvie Canépa¹, Anne-Lyse Lainé, Aurélie Bluteau, Claudette Fagu, Chantal Flon et Danielle Monniaux

Résumé : Une méthode de dosage immunoenzymatique (EIA) de la progestérone a été mise au point. Elle a été validée pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. La méthode est sensible, spécifique, précise et exacte. L'étendue de gamme de 0.25 à 32 ng/ml (0.8 à 102 nM) et la limite de quantification de 0.4 ng/ml (1.3 nM) sont compatibles avec les taux plasmatiques physiologiques de progestérone observés au cours du cycle oestrien des ovins et des bovins. Les résultats obtenus sont bien corrélés à ceux estimés par un dosage radioimmunologique (RIA) ($R = 0.84$, $n = 358$ et $R = 0.94$, $n = 100$, pour des plasmas ovins et bovins, respectivement). Enfin, cette méthode permet d'analyser de façon simple, rapide, automatisée et peu coûteuse un grand nombre d'échantillons par série de dosage.

Mots clés : Progestérone, immunodosage, EIA, RIA, ovin, bovin

1. Introduction

La progestérone est une hormone stéroïdienne synthétisée à partir du cholestérol. Elle joue un rôle essentiel dans la fonction de reproduction chez la femelle des mammifères. Elle est nécessaire à la préparation puis au maintien de la gestation. Elle est synthétisée dans l'ovaire et le placenta ainsi que pour une très faible part dans les surrénales (Robel P., 2001). Chez la femelle non gravide, la progestérone est sécrétée de façon cyclique par l'ovaire : elle n'est pas détectable dans le sang pendant la phase folliculaire mais elle est sécrétée en grandes quantités par le corps jaune après l'ovulation, pendant la phase lutéale du cycle oestrien ou menstruel (Driancourt M.A. *et al*, 2001). En cas de gestation, la sécrétion de progestérone va persister à la fin du cycle fécondant et durera pendant toute la gestation (Martal J. *et al*, 2001). Le taux plasmatique de progestérone est un bon indicateur de l'état d'activité ovarienne. Chez les femelles des animaux de ferme, la surveillance du taux plasmatique de la progestérone permet de déterminer si l'animal est en période d'activité sexuelle, de caractériser les cycles ovariens et enfin d'affirmer la non-gestation de l'animal quand un taux plasmatique nul de progestérone est observé au moment supposé des chaleurs (Thimonier J., 2000).

Les méthodes de dosage de la progestérone sont des immunodosages. Du fait de la masse faible de la progestérone, seules des méthodes d'immunodosage dites par compétition sont possibles : la progestérone à doser est en compétition avec une progestérone conjuguée à un marqueur pour se lier à un anticorps utilisé en quantité restreinte. Les méthodes diffèrent ensuite selon la nature du signal émis par le traceur utilisé : radioactif (Saumande J. *and al*, 1985, Lupi-Chen N. *et al*, 1999), colorimétrique (Munro C. *and al*, 1984), fluorescent (Kakabakos S.E. *and al*, 1992), luminescent (Kohen F. *and al*, 1987). Elles diffèrent

¹ INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux-
UMR 6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements. 37380 Nouzilly, France
☎ 02 4742 77 87 ✉ laine@tours.inra.fr

également par la méthode de séparation utilisée pour déterminer la quantité de traceur qui s'est lié à l'anticorps: précipitation puis séparation par centrifugation pour les méthodes dites en phase liquide ou simple lavage pour les méthodes dites en phase solide. On distingue enfin les méthodes de dosage précédées par une phase d'extraction de la progestérone du plasma par des solvants organiques et les méthodes dites « directes ». L'extraction préalable en éliminant les protéines plasmatiques, dont les protéines de liaison des stéroïdes, et les stéroïdes conjugués permet de minimiser les interférences dans le dosage.

Nous disposons au laboratoire d'une méthode de dosage radioimmunologique (RIA) utilisant comme conjugué de la progestérone tritiée (Terqui M. and al, 1974). Nous avons validé il y a quelques années cette méthode pour un dosage direct, sans extraction préalable, dans le plasma des espèces ovine, caprine, bovine, porcine et équine (documents internes de validation). La méthode est sensible, précise, et exacte. Elle permet de traiter plusieurs centaines d'échantillons par série de dosage et de rendre des résultats à partir de 24 à 72 h après le début du dosage, en fonction du nombre d'échantillons dosés mais elle est peu automatisable et surtout, l'utilisation de traceur radioactif est toujours un risque pour la santé et l'environnement.

C'est pourquoi nous avons cherché à mettre au point une méthode de dosage non radioimmunologique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des animaux de ferme. Les objectifs associés étaient d'avoir la possibilité de s'affranchir de l'étape d'extraction préalable au dosage, d'obtenir une sensibilité telle que les points critiques décisionnels pour le diagnostic de cyclicité et le diagnostic de non-gestation soient dans une zone de confiance de la gamme étalon, de permettre l'automatisation du dosage ainsi que le traitement d'un grand nombre d'échantillons par série de dosage.

Nous avons mis au point une méthode de dosage immunoenzymatique (EIA). Nous en présentons ici les résultats de validation pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins.

2. Matériel et méthodes

2.1 Les animaux et les prélèvements de sang

Les brebis étudiées étaient de race Lacaune, Limousine ou Romane. L'activité ovarienne des brebis Lacaune a été synchronisée par un traitement hormonal progestagène utilisant une éponge vaginale imprégnée d'acétate de fluorogestone (FGA, Intervet) alors que celle des brebis Limousine et Romane a été induite par l'introduction du mâle. Les vaches étaient des vaches laitières de race Prim'Holstein dont le cycle oestrien était synchronisé par deux injections de prostaglandines réalisées à 11 jours d'intervalle (PGF2 α , Prosolvin).

Les prélèvements de sang ont été effectués dans la veine jugulaire des animaux sur vacutainer hépariné. Après centrifugation à 2000g pendant 15 minutes à 4°C, le plasma a été isolé et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

2.2 Les tampons

Sauf indication, tous les réactifs chimiques utilisés pour ces tampons proviennent de Prolabo. Le tampon de « coating » est un tampon 50mM carbonate/bicarbonate pH 9.6. Le tampon de lavage est un tampon 25mM Tris (MP Biomedicals), 37mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 0.1 g/l NaN₃, pH 7.5, 0.05% v/v Tween (Sigma). Le tampon de saturation et de dilution est un tampon 100mM Tris, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂ (Sigma), 0.5g/l NaN₃, pH 7.5, 5g/l Albumine bovine (BSA) (Sigma). Le tampon phosphate est un tampon 0.1M phosphate, 0.155M NaCl, 1 g/l gélatine, 1g/l NaN₃, pH 7.

2.3 La préparation des gammes de progestérone

Les gammes sont préparées par surcharge de progestérone (Steraloid) de 0.25 à 32 ng/ml dans un pool de plasma de brebis ovariectomisées ou dans du plasma de bœuf (plasma « zéro »). Les gammes de progestérone utilisées pour les dosages après extraction sont préparées dans du tampon phosphate.

2.4 L'extraction de la progestérone plasmatique

500 µl de plasma sont mélangés à 3 ml d'un mélange v/v d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (Carlo Erba). Les deux phases sont séparées par congélation. La phase organique liquide, qui contient la progestérone extraite, est récupérée puis évaporée. Les culots secs sont solubilisés dans 500 µl de tampon phosphate.

2.5 La méthode RIA de dosage de la progestérone dans le plasma

100 µl des échantillons ou 100 µl des différents points de gamme sont distribués dans des tubes. 500 µl d'une solution préparée en tampon phosphate contenant 25 nCi/ml de progestérone tritiée ([1,2,6,7,16,17-3H] progestérone, GE Healthacare), du sérum de lapin anti-progestérone (anti-progestérone-11 α -hemisuccinate-BSA, INRA, Nouzilly) dilué au 1/33333, et 3 µg/ml d'immunoglobulines G de lapin (INRA, Nouzilly) sont ajoutés. Après une incubation d'une heure à 40°C, 50 µl d'une solution de Sérum de Mouton anti-Immunoglobulines de Lapin (INRA, Nouzilly) au 1/10 en tampon phosphate et 1 ml de solution 45 g/l PEG 4000 (Prolabo) sont distribués.

Après une nouvelle incubation d'au moins 3 heures à 4°C, les tubes sont centrifugés à 2000 g pendant 45 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et 100 µl d'éthanol (Carlo Erba) puis 2 ml de liquide de scintillation (UltraGold MV, Perkin Elmer) sont ajoutés. Après bouchage et agitation des tubes, le comptage est effectué sur un compteur Beta à scintillation liquide (Packard Tricarb 2900, Perkin Elmer). Chaque tube est compté pendant une minute.

2.6 La méthode EIA de dosage de la progestérone dans le plasma

2.6.a La préparation des plaques

150 µl d'une solution d'immunoglobulines G de chèvre anti-immunoglobulines G de souris (Uptima, Interchim) diluées au 1/1600 (environ 0.2 µg par puits) dans du tampon de « coating » sont distribués dans tous les puits d'une plaque EIA 96 puits (Immuno Maxisorp C96, Nunc). Après incubation à 4°C pendant au moins une nuit, les immunoglobulines qui ne se sont pas adsorbées sur les parois des puits sont éliminées par lavage (laveur LP41 Adill, Perkin Elmer) avec 3 fois 450µl par puits de tampon de lavage. La saturation est effectuée en distribuant 200 µl de tampon de dilution dans tous les puits. Après une incubation de 4h à température ambiante, les plaques sont asséchées par retournement puis scellées avec un film plastique. Elles sont ensuite stockées à -20°C et décongelées au fur et à mesure de leur utilisation.

2.6.b Le dosage EIA

L'anticorps anti-progestérone est un anticorps monoclonal de souris obtenu par immunisation avec un conjugué progestérone-11 α -hemisuccinate-BSA (Biogenesis, Abcys SA). 140 µl d'anticorps dilué au 1/160000 dans le tampon de dilution (soit environ 0.9 ng/puits) sont distribués dans tous les puits à l'exception de 2 puits. Dans ces 2 puits, destinés à mesurer les liaisons non spécifiques, 140 µl de tampon de dilution sont distribués.

10 µl de point de gamme en duplicate ou 10 µl d'échantillon sont ensuite ajoutés par un automate de distribution (Multiprobe, Perkin Elmer). Un échantillon de contrôle est distribué en 4 replicates dans toutes les plaques de chaque dosage. Les plaques sont scellées avec un film plastique, agitées pendant quelques secondes (agitateur Heidolph, Titramax 1000) puis incubées à 4°C pour la nuit.

Le lendemain, 50 µl d'une solution de conjugué progestérone-11 α -hemisuccinate-phosphatase alcaline (Immunometrics, London) diluée au 1/60000 sont ajoutés dans tous les puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 1h à température ambiante, à l'obscurité, sous agitation constante. Après lavage des plaques, 150µl d'une solution de 1 mg/ml de pNPP (p-nitrophenylphosphate, Sigma) en 100mM Diethanolamine (Sigma) 5mM MgCl₂ pH 9.8 sont distribués dans tous les puits. Après une incubation des plaques pendant 2h à 37°C, la lecture est effectuée à 405 nm (Spectracount, Perkin Elmer).

2.7 La méthode d'évaluation de la spécificité du dosage

Des gammes de 1 à 1000 ng/ml de stéroïdes de différentes classes (Steraloid ou Sigma) ont été établies dans le plasma ovin « zéro ». Le dosage EIA a été conduit dans les mêmes conditions que celles déjà décrites en incluant dans chaque plaque une gamme de progestérone préparée en plasma ovin. Pour chacun des stéroïdes testés, la concentration à 50% de liaison a été évaluée. Le rapport entre cette concentration et la concentration de progestérone à 50% de liaison a ensuite été établi.

2.8 La méthode d'évaluation de l'exactitude du dosage

L'exactitude du dosage a été vérifiée par un test de surcharge et par un test de dilution. Dans le test de surcharge, les échantillons plasmatiques de 6 brebis ou de 6 vaches, faiblement concentrés en progestérone, ont été surchargés avec différentes quantités de progestérone. Dans le test de dilution, les échantillons plasmatiques de 6 brebis ou de 6 vaches ayant une concentration élevée en progestérone ont été dilués de 2 en 2 avec du plasma « zéro » (respectivement plasma de brebis ovariectomisée ou plasma de bœuf). Le rendement, qui est le rapport de la concentration obtenue à la concentration théoriquement attendue, a été estimé dans chaque cas. Nous avons ensuite calculé une moyenne de ce rendement pour chaque niveau de surcharge et chaque niveau de dilution.

2.9 Les calculs

Le signal utilisé dans la présentation des résultats est le pourcentage de liaison (ou B/Bo) qui est le rapport entre la Densité Optique (DO) (ou les coups par minute (cpm)) du point de gamme ou de l'échantillon et la DO (ou les cpm) du plasma « zéro ». Les calculs de concentrations estimées à partir des dosages EIA et RIA ont été effectués en utilisant une méthode de régression logistique à 4 paramètres dans le logiciel Riasmart (Perkin Elmer). Le coefficient de variation, utilisé dans l'appréciation de la précision, est le rapport de l'écart-type sur la moyenne. Les calculs de coefficients de corrélation de Pearson ont été effectués avec le logiciel Excel.

3. Résultats

3.1 Etendue de gamme et sensibilité du dosage

Nous présentons **figure 1** les résultats obtenus en EIA et en RIA pour les gammes préparées en plasma ovin (moyenne de 9 dosages) et en plasma bovin (moyenne de 7 dosages).

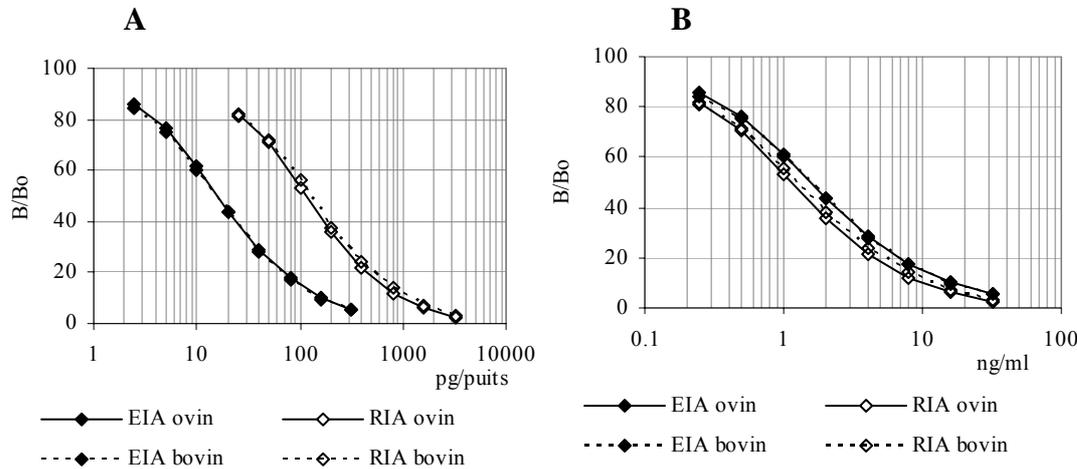


Figure 1: Résultats des gammes plasmatiques de progestérone dans les dosages EIA et RIA ovin et bovin. Le signal est exprimé en fonction de la quantité par puits (A) ou en fonction de la concentration (B) de progestérone.

Les courbes de signal établies en fonction de la quantité de progestérone par tube (partie A de la figure) démontrent que la sensibilité intrinsèque du dosage EIA est environ 10 fois plus importante que celle du dosage RIA. Mais cet avantage de sensibilité ne persiste pas quand on observe les courbes de signal en fonction de la concentration de progestérone (partie B de la figure). Ceci est dû à un volume dosé moins important en EIA (10 μ l) qu'en RIA (100 μ l). En pratique donc, pour des analyses sur plasma, la sensibilité du dosage EIA est comparable à celle du dosage RIA.

On observe par ailleurs que les courbes de signal de gamme plasmatique ovine et bovine sont superposées. Ce n'est plus le cas lorsque les résultats sont exprimés en DO, l'ensemble des DO en présence de plasma ovin étant abaissé par rapport aux DO en présence de plasma bovin (non montré). C'est pourquoi il est nécessaire de conserver une gamme plasmatique spécifique de chaque espèce animale.

L'étendue de gamme obtenue en EIA va de 0.25 à 32 ng/ml (0.8 à 102 nM). Le point 80 % de liaison, généralement considéré comme la limite à partir de laquelle les échantillons peuvent être mesurés avec une précision acceptable, correspond ici à 0.4 ng/ml. La plage des concentrations allant de 1 à 2 ng/ml (3 à 6 nM), qui sont des concentrations-seuils dans le diagnostic de positivité de progestéronémie, se situe dans une zone de confiance de la gamme, entre 60 et 40 % de liaison.

3.2 Spécificité du dosage

La spécificité de l'anticorps anti-progestérone utilisé pour le dosage EIA a été établie dans les conditions du dosage ovin en utilisant des gammes de différentes classes de stéroïdes. Les résultats, présentés dans le **tableau 1**, montrent une réaction croisée de l'ordre de 40 % avec un métabolite hépatique direct de la progestérone, le 5 α -pregnan-3, 20-dione, et de l'ordre

de 2% avec la 17-hydroxyprogestérone. Aucun autre stéroïde, aussi bien dans la classe des corticostéroïdes que celle des androgènes ou des oestrogènes, n'est reconnu par l'anticorps anti-progestérone. On note également l'absence de réaction croisée de l'anticorps anti-progestérone avec l'acétate de fluorogestone (FGA), progestagène de synthèse utilisé dans la synchronisation de l'oestrus dans l'espèce ovine.

Stéroïde	Réaction croisée (%)
Progestérone	100
5 α -pregnan-3, 20-dione	40
17-hydroxyprogestérone	1.6
Pregnenolone	0.2
17-hydroxypregnenolone	<0.1
17 α , 20 β -dihydroxyprogestérone	<0.1
Fluorogestone acétate	<0.1
Cortisol	<0.1
Corticostérone	0.3
Cortisone	<0.1
Deoxycorticostérone acétate	<0.1
Androsténolone	<0.1
Testostérone	<0.1
Androstenediol	<0.1
Androstenedione	0.55
5 β -androstane-3 β , 17 β -diol	<0.1
4-androstène-11 β -ol-3, 17-dione	<0.1
Oestriol	<0.1
Oestrone	<0.1
17 β -oestradiol	<0.1

Tableau 1: Estimation de la réaction croisée à 50 % de liaison de différents stéroïdes avec l'anticorps anti-progestérone dans les conditions du dosage EIA ovine

3.3 Précision du dosage

Nous présentons dans la **figure 2** un profil de précision intra-dosage du dosage EIA ovine. Le profil de précision est la représentation graphique de la dispersion de la mesure des duplicates d'échantillons, appréciée par le coefficient de variation en fonction de la concentration. Dans ce profil, on distingue deux zones avec, dans les basses concentrations, une zone de dispersion des duplicates puis, dans une plage de concentrations comprises entre 0.4 et 10 ng/ml, une zone de bonne précision dans laquelle les coefficients de variation des duplicates ne sont qu'exceptionnellement supérieurs à 20% et sont pour leur majorité inférieurs à 10%. Ces résultats nous permettent de confirmer la limite de quantification du dosage aux environs de 0.4 ng/ml.

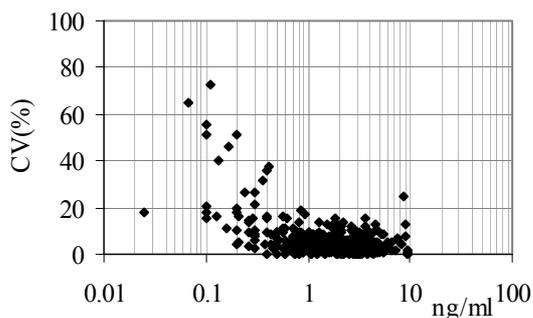


Figure 2 : Profil de précision intra-dosage des duplicates de 372 échantillons plasmatiques ovins

La précision inter-dosage est déterminée en analysant le même échantillon dans tous les dosages. Le coefficient de variation inter-dosage de l'échantillon de contrôle utilisé en EIA ovin est de 4.3%, ceci pour une concentration moyenne de 1 ng/ml, un B/Bo moyen de 60% estimés lors de 9 dosages consécutifs.

La précision du dosage EIA bovin est comparable à celle du dosage ovin (non montré).

3.4 Exactitude du dosage

L'exactitude du dosage a été évaluée par des tests de surcharge d'échantillons de plasma ovin et de plasma bovin avec de la progestérone et par des tests de dilution d'échantillons de plasma ovin et bovin dans le plasma « zéro » ovin ou bovin.

Les résultats de ces tests sont montrés dans les **tableaux 2 et 3**. On voit que les rendements moyens, qui sont les rapports des concentrations obtenues et attendues, sont proches de 100 %. Les valeurs minimales et maximales de ces rendements restent dans une fourchette de 80-120% sauf pour le test de dilution ovin qui s'en écarte un peu.

	Progestérone ajoutée (ng/ml)	Moyenne des B/Bo (%)	Moyenne des concentrations obtenues (ng/ml +/- SD)	Moyenne des concentrations attendues (ng/ml)	Rendement moyen (%) (Min - Max)
EIA ovin	0	49	1.4 +/- 0.4		
	0.8	41	2.0 +/- 0.4	2.1	92 (81-113)
	1.6	34	2.6 +/- 0.5	2.9	90 (80-118)
EIA bovin	0	70	0.7 +/- 0.3		
	0.8	52	1.6 +/- 0.4	1.5	104 (93-113)
	1.6	41	2.5 +/- 0.4	2.3	107 (93-119)
	3.2	30	4.1 +/- 0.7	3.9	104 (90-118)

Tableau 2 : Résultats des tests de surcharge. Moyenne des résultats obtenus pour 6 échantillons de plasma de brebis ou de vache surchargés avec 0.8, 1.6 et éventuellement 3.2 ng/ml de progestérone. Le rendement est le rapport de la concentration obtenue sur la concentration attendue. Ses valeurs minimale et maximale sont indiquées pour chaque groupe.

	Facteur de dilution	Moyenne des B/Bo (%)	Moyenne des concentrations obtenues (ng/ml +/- SD)	Moyenne des concentrations attendues (ng/ml)	Rendement moyen (%) (Min - Max)
EIA ovin	1	23	5.2 +/- 0.7		
	2	34	3.0 +/- 0.3	2.6	117 (105-128)
	4	53	1.5 +/- 0.2	1.3	115 (92-136)
	8	71	0.7 +/- 0.1	0.7	111 (92-131)
EIA bovin	1	26	5.2 +/- 0.5		
	2	41	2.5 +/- 0.2	2.6	97 (92-104)
	4	57	1.3 +/- 0.1	1.3	102 (97-112)
	8	75	0.6 +/- 0.1	0.7	92 (76-106)

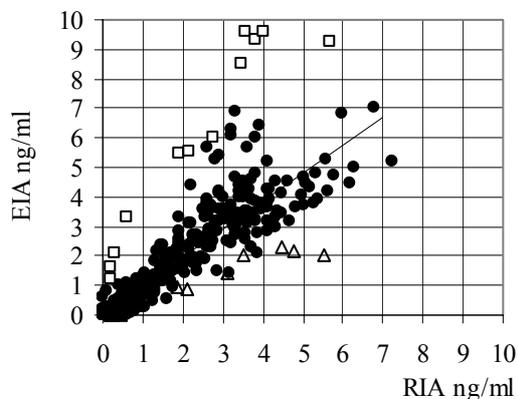
Tableau 3 : Résultats des tests de dilution. Moyenne des résultats obtenus pour 6 échantillons de plasma de brebis ou de vache dilués au 1/2, 1/4 et 1/8 respectivement dans le plasma « zéro » ovin ou bovin. Le rendement est le rapport de la concentration obtenue sur la concentration attendue. Ses valeurs minimale et maximale sont indiquées pour chaque groupe.

3.5 Corrélation des résultats du dosage EIA avec les résultats du dosage RIA

Les résultats obtenus par le dosage EIA de progestérone ont été comparés avec ceux obtenus par la méthode de dosage RIA.

Figure 3 : Corrélation EIA/RIA pour le dosage de progestérone de 358 échantillons plasmatiques prélevés sur 94 brebis.

L'équation de la droite de régression est $y = 1.022x + 0.028$ avec $R = 0.84$



La **figure 3** montre les résultats de corrélation EIA/RIA obtenus pour le dosage ovin direct. On observe une corrélation de bon niveau entre les résultats EIA et RIA avec un coefficient R de 0.84. Les résultats de deux brebis ayant subi chacune 12 prélèvements et représentés respectivement par des carrés ou des triangles blancs s'écartent cependant nettement de la zone centrale du nuage de points. En raison de ces résultats la progestéronémie de ces 2 brebis a été également dosée après extraction plasmastique.

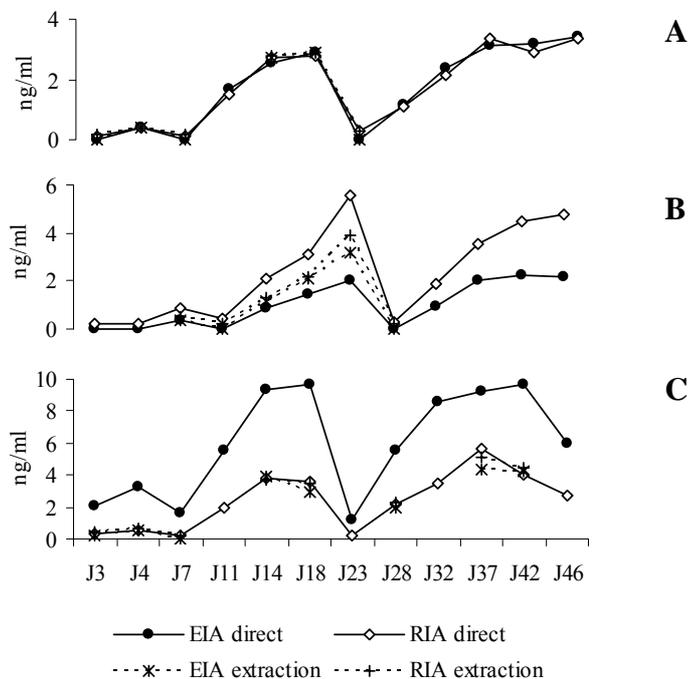


Figure 4: Résultats des dosages EIA et RIA direct et par extraction de progestérone pour 3 brebis A, B et C, avec en abscisse le nombre de jours après l'introduction du bélier.

La **figure 4** montre des profils de suivi de progestéronémie évaluée chez 3 brebis notées de A à C par les 4 méthodes : méthode EIA ou RIA avec ou sans extraction préalable. On note sur ces profils l'existence de 3 cycles de progestérone synchrones quelle que soit la méthode d'analyse et quelle que soit la brebis. Le 1^{er} pic de faible amplitude aux alentours de 0.5 ng/ml qui correspond au cycle court souvent déclenché par l'effet mâle est détecté par toutes les méthodes.

Ce qui diffère éventuellement entre ces 3 profils est le niveau respectif du taux de progestérone évalué par les quatre méthodes. En A sont montrés les résultats d'une brebis pour laquelle les résultats obtenus par les 4 méthodes sont confondus. 22 des 24 brebis suivies, soit plus de 90% des brebis, ont ainsi montré des niveaux EIA très proches de ceux obtenus en RIA.

Le profil de la brebis déjà signalée **figure 3** et dont les résultats en dosage direct EIA sont inférieurs à ceux obtenus par le dosage direct RIA est montré en B. On observe que les résultats obtenus après extraction de la progestérone de ce plasma sont d'un niveau intermédiaire entre les résultats directs EIA et RIA, et dans les valeurs basses de progestérone, ils sont même plus proches des résultats directs EIA.

Le profil de la brebis dont les résultats du dosage direct EIA sont supérieurs à ceux obtenus par le dosage direct RIA est montré en C. On voit que les résultats EIA ou RIA après extraction sont confondus avec les résultats du dosage RIA direct et que pendant tout le suivi, les résultats du dosage EIA restent plus élevés que les autres résultats et ne s'abaissent jamais au dessous de 1 ng/ml. Ces résultats signifient que l'extraction élimine une interférence à l'origine, dans le dosage EIA direct dans le plasma de cet animal, d'un signal EIA trop bas et donc d'une concentration estimée trop élevée. La détection par l'anticorps anti-progestérone d'une concentration anormalement élevée chez cet animal du métabolite partiellement reconnu par cet anticorps, le 5 α -pregnan-3, 20-dione, n'est pas en cause puisque l'extraction (qui n'élimine pas ce métabolite) normalise la concentration de progestérone de cet animal. La présence dans ce plasma d'anticorps dirigés contre les Immunoglobulines de souris ou de chèvre, qui pourraient bloquer la liaison du conjugué progestérone-phosphatase alcaline à l'anticorps anti-progestérone immobilisé sur la phase solide, a été éliminée par une analyse en Biacore (non montré). L'explication la plus probable est la fixation du conjugué progestérone-phosphatase alcaline sur des protéines ou des lipoprotéines, voire des acides gras libres, présents dans le plasma de cet animal, avec pour conséquence une diminution de la liaison du conjugué avec l'anticorps anti-progestérone immobilisé.

Les figures 5 et 6 montrent les résultats de la corrélation EIA/RIA pour le dosage dans le plasma bovin. Le coefficient R de corrélation est de 0.94 et les profils de progestéronémie montrés sur 2 vaches suivies chacune sur 20 prélèvements sont proches.

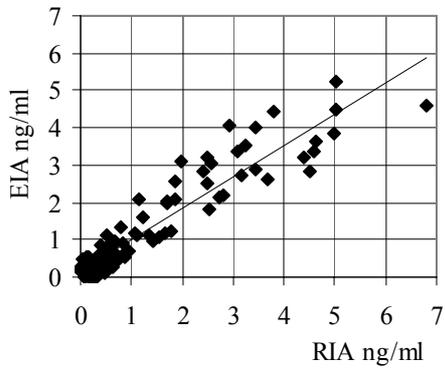


Figure 5 : Corrélation EIA/RIA pour le dosage de progestérone dans le plasma bovin (5 vaches, 100 prélèvements).

L'équation de la droite de régression est $y = 0.839x + 0.169$ avec $R = 0.94$

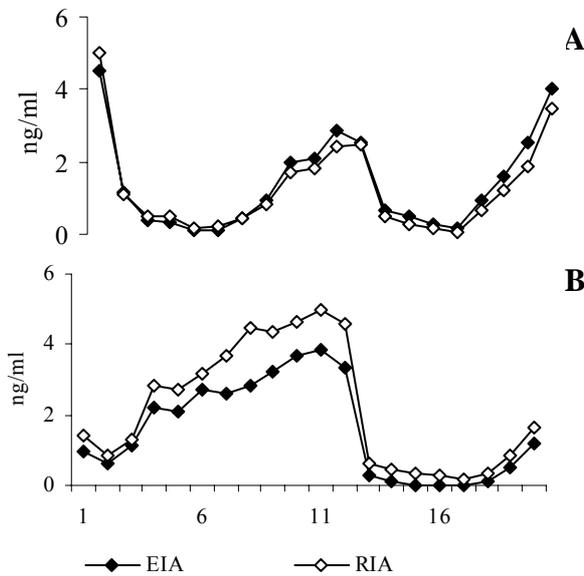


Figure 6: Résultats des dosages EIA et RIA dans le plasma de 2 vaches A et B. En abscisse figure le numéro de prélèvement.

Conclusion

Le dosage EIA de progestérone mis au point dans le laboratoire est caractérisé par une immobilisation de l'anticorps anti-progestérone par capture, une étape de pré incubation de l'échantillon avec l'anticorps anti-progestérone immobilisé, et une addition retardée du conjugué progestérone-enzyme. La pré incubation entre l'échantillon et l'anticorps anti-progestérone permet d'augmenter la sensibilité en avantageant la liaison entre la progestérone et son anticorps. Cet avantage est d'autant plus important que la progestérone et le conjugué progestérone-enzyme ayant des masses molaires très différentes (respectivement 314 Daltons et plus de 100 000 Daltons), le déplacement par la progestérone du conjugué une fois celui-ci lié à l'anticorps est illusoire. L'addition retardée du conjugué progestérone-enzyme permet

également de minimiser les interférences de celui-ci avec les composants sériques. Nous avons privilégié des étapes d'incubation longues pour traiter plusieurs plaques par dosage sans dérive significative.

Ce dosage a été validé pour le dosage direct de progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. Son étendue de gamme de 0.25 à 32 ng/ml (0.8 à 102 nM) et sa limite de quantification de 0.4 ng/ml (1.3 nM) sont compatibles avec les taux plasmatiques observés chez ces deux espèces animales.

Le dosage est spécifique de la progestérone à l'exception d'un métabolite hépatique direct de la progestérone caractérisé par la disparition d'une double liaison entre 2 atomes de carbone, le 5 α -pregnan-3, 20-dione. Les concentrations circulantes de ce métabolite de la progestérone très souvent reconnu par les anticorps anti-progestérone (Gani M. *and al*, 1994) restent négligeables devant celle de la progestérone (Murphy B.E.P. *and al*, 2000).

Les résultats des tests de surcharge et de dilution de différents échantillons plasmatiques ovins et bovins permettent d'accepter l'exactitude du dosage.

Les résultats du dosage EIA sont corrélés de façon satisfaisante aux résultats d'un dosage RIA utilisant la progestérone tritiée et conduit en phase liquide. L'étude des cycles montre des variations de progestérone synchrones dans les 2 méthodes et met en évidence le cycle court souvent induit par l'effet mâle et caractérisé par un pic faible et transitoire de progestérone. Une des brebis étudiées avait un taux plasmatique de progestérone qui ne s'annulait jamais en dosage EIA direct et qui était en contradiction avec les résultats obtenus par l'extraction ou le dosage RIA. Nous avons retenu comme explication une interférence du conjugué progestérone-enzyme avec des constituants protéiques ou/et lipidiques présents dans ce plasma. Ce mécanisme de surévaluation de la concentration plasmatique des stéroïdes par des dosages directs a déjà été décrit (Micaleff J.V. *and al*, 1995). L'extraction de la progestérone du plasma est trop lourde, trop lente et trop coûteuse pour être faite systématiquement mais elle peut être faite à la demande devant ce type de profil avec des progestéronémies élevées et qui ne s'annulent pas au moment supposé des chaleurs alors que la femelle n'est pas gestante. Avec le recul, nous n'avons plus observé ce type de profil chez d'autres brebis ni chez des vaches et il est donc possible que cet animal ait eu une anomalie en particulier du métabolisme des lipides.

Le niveau de précision intra- et inter-dosage de bon niveau ainsi que l'automatisation de la conduite de ce dosage sont compatibles avec le dosage de séries consécutives d'échantillons. Enfin, le coût du dosage est réduit.

Ce dosage EIA est maintenant pratiqué de façon usuelle dans le laboratoire pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins et il est en cours de validation pour le dosage dans le plasma des autres espèces d'animaux de ferme.

Bibliographie

Driancourt MA, Levasseur MC, (2001), Cycles estriens et cycles menstruels. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme" Thibault C., Levasseur M.C. Eds, INRA, Ellipses, Paris Chapitre 30, 680-698.

Gani M, Coley J, Piron J, Humphreys A.S, Arevalo J, Wilson IA, Taussig MJ, (1994), Monoclonal antibodies against progesterone: effect of steroid-carrier coupling position on antibody specificity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 48, 277-282.

Kakabakos SE and Khosravi MJ, (1992), Direct time-resolved fluorescence immunoassay of progesterone in serum involving the biotin-streptavidin system and the immobilized-antibody approach. *Clin. Chem.* 38: 725-730.

- Kohen F, De Boever J, Kim JB, (1987), Recent advances in chemiluminescence-based immunoassays for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 27, 71-79.
- Lupi-Chen N, Hoang BM, Cailla H., (1999), Immunodosage des stéroïdes : testostérone, progestérone et cortisol chez les animaux. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 14, 269-275.
- Martal J et Haddad B, (2001), Physiologie et endocrinologie placentaires. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme" Thibault C., Levasseur M.C. Eds, INRA, Ellipses, Paris Chapitre 23, 505-532.
- Micallef JV, Hayes MM, Latif A, Ahsan R, Sufi SB, (1995), Serum binding of steroid tracers and its possible effects on direct steroid immunoassay. *Ann. Clin. Biochem.* 32, 566-574.
- Munro C, Stabenfeldt G, (1984), Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *Journal of Endocrinology* 101, 41-49.
- Murphy BEP and Allison CM, (2000), Determination of progesterone and some of its neuroactive ring A-reduced metabolites in human serum. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 74, 137-142.
- Robel P, (2001), La stéroïdogénèse : les enzymes et la régulation de leur expression génomique. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme" Thibault C., Levasseur M.C. Eds, INRA, Ellipses, Paris Chapitre 7, 144-154.
- Saumande J, Tamboura D and Chupin D, (1985), Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and of embryos collected. *Theriogenology* 23, 719-731.
- Terqui M and Thimonier J, (1974), New rapid radioimmunologic method for estimation of plasma progesterone. Application to early diagnosis of gestation in the ewe and goat. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 279, 1109-1112.
- Thimonier J, (2000), Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone. *INRA Prod. Anim.* 13, 177-183.