

**Description des profils de différents œstrogènes  
pendant la gestation de juments de différentes races  
par chromatographie liquide couplée au spectromètre  
de masse**

**Description of different estrogens profiles during the gestation of  
mares of different breeds by liquid chromatography coupled with the  
mass spectrometer**

**Joy LEDECK**

**Travail de Master de spécialisation**

présenté en vue de l'obtention du Master de spécialisation en sciences vétérinaires : Internat  
clinique

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2020-2021**



## **Remerciements**

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance, dans un premier temps, à mon promoteur Monsieur Ponthier J., Docteur en Sciences Vétérinaires et diplômé du Collège Européen de la reproduction animale, de m'avoir permis de prendre part à ce projet de recherche, pour sa confiance, la transmission de savoir, sa disponibilité et surtout pour ses conseils constructifs qui ont permis à améliorer ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe pédagogique de l'Université de Liège responsable de notre formation, de la mise à disposition des installations ainsi que pour son soutien.

Je remercie chaleureusement nos éleveurs pour l'accueil dans leurs installations afin de mener à bien notre projet qui, sans eux, n'aurait été possible.

Je tiens à remercier toute l'équipe de la clinique équine qui a contribué au succès de cet internat, pour cette année riche en nouvelles connaissances et pratiques, pour les savoirs qu'ils ont généreusement partagés, pour leur confiance ainsi que pour leur bonne humeur au quotidien.

Je remercie mes très chers parents, Olivier et Laurence, qui ont toujours été là pour moi, qui ont cru en moi et qui me soutiennent dans toutes les décisions que je prends.

Un grand merci à Loïc, mon compagnon, pour ce soutien et encouragement au quotidien.

Je voudrais également remercier mes grands-parents pour leur soutien.

## **Sommaire**

Résumé

Summary

### 1. Introduction

1.1. Contexte

1.2. Gestation physiologique

1.3. Mise en place de la placentation

1.4. Maintien hormonal de la gestation

1.4.1. Les progestagènes et la progestérone

1.4.1.1. Cinétique et sources de production

1.4.2. Les œstrogènes

1.4.2.1. Cascade menant à la production d'œstrogènes

1.4.2.2. Cinétique et sources de production

1.4.2.3. Rôle des œstrogènes

1.4.2.4. Méthodes de dosage des œstrogènes

1.5. Placentite

1.6. Buts de l'étude

### 2. Matériels et méthodes

2.1. Conditions d'élevage

2.2. Evaluation échographique des unités fœto-maternelles

2.3. Technique de prélèvement et de conservation des échantillons sanguins

2.4. Technique d'analyse à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée au spectromètre de masse

2.5. Evaluation des placentas

2.6. Méthodes statistiques

### 3. Résultats

### 4. Discussion

### 5. Conclusion

### 6. Références bibliographiques

# **Description des profils de différents œstrogènes pendant la gestation de juments de différentes races par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse**

## **RÉSUMÉ**

Les placentites sont une cause majeure d'avortement chez la jument. Récemment, un nouveau test diagnostique a été proposé pour la détecter : le dosage d'œstrogènes. Cependant, la précision et la standardisation des dosages immuno-enzymatiques utilisés empêchent toutes comparaisons ou l'établissement de valeurs limites. Pour ces raisons, la chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse dotée d'une grande exactitude, précision et spécificité a été développée afin de standardiser les concentrations œstrogéniques. Le but de cette étude est de décrire l'évolution de l'œstradiol, l'œstrone et l'œstrone-sulfate durant la deuxième moitié de la gestation chez des juments pure race espagnole et demi-sang grâce à cette technique. Les courbes de concentrations œstrogéniques durant la gestation physiologique ont pu être tracées et un effet race au niveau des concentrations en œstrogènes non sulfoconjugués a été relevé. De nombreuses perspectives s'ouvrent également, comme un screening complet des œstrogènes par chromatographie en phase liquide couplée au spectromètre de masse avec une attention particulière à l'effet de la race, du sexe et de la parité et l'élaboration de cultures de cellules allanto-chorioniques pour déterminer les changements de productions hormonales en cas de placentite.

**MOTS CLÉS** : Jument, gestation, œstrogènes, placentite, chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse.

# **Description of different estrogens profiles during the gestation of mares of different breeds by liquid chromatography coupled with the mass spectrometer**

## **SUMMARY**

Placentitis is a major cause of abortion in mares. Recently, a new diagnostic test has been proposed to detect it : the estrogen assay. However, the precision as well as the standardization of immuno assays currently used avoid any comparisons or the establishment of cut-off values. For these reasons, liquid chromatography coupled with a mass spectrometer with high accuracy, precision and specificity has been developed in order to standardize estrogenic concentrations. The aim of this study is to describe the course of estradiol, estrone and estrone sulfate during the second half of gestation in purebred Spanish and half-blood mares using this technique. The curves of estrogenic concentrations during physiological gestation could be drawn and differences between breed were observed. Many perspectives are also opening up as a complete screening of estrogen by liquid chromatography coupled with a mass spectrometer with particular attention to the effect of race, sex and parity. The development of allanto-chorionic cells cultures with cellular distress could also allow to observe changes in estrogens production in case of placentitis.

**KEYWORDS** : Mare, pregnancy, estrogens, placentitis, liquid chromatography coupled to a mass spectrometer.

## 1. Introduction

### 1.1. Contexte

Les placentites sont une cause majeure d'avortement chez la jument (Murase *et al.*, 2015). La prévalence des affections placentaires oscille entre 5 et 15% en fonction des auteurs et de la population étudiée, ce qui provoque des déceptions et des pertes financières chez les éleveurs (Bucca, 2006).

Le plus gros enjeu d'une placentite est son diagnostic. En effet, peu de symptômes sont exprimés lors de la pathologie (Campos *et al.*, 2017). Récemment, un nouveau test diagnostique a été proposé pour détecter un avortement imminent ou une placentite afin de pouvoir la traiter précocement : le dosage de certains œstrogènes : œstrone (E1), œstrone sulfate (E1S) et œstradiol (E2) (Canisso *et al.*, 2017). Cependant, la précision ainsi que la standardisation des dosages immuno-enzymatiques utilisés actuellement empêchent les comparaisons et l'établissement de valeurs limites (Dufour *et al.*, 2021). Pour toutes ces raisons, une autre technique de mesure a été développée afin de standardiser les concentrations en œstrogènes observées chez différentes espèces et lors de pathologies, c'est la chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (LC-MS) (Conley, 2016 ; Conley et Ball, 2019 ; Dufour *et al.*, 2021).

L'endocrinologie chez la jument est complexe mais la détermination de concentrations hormonales standardisées permettrait de diagnostiquer précocement des pathologies liées à la gestation équine. Cela permettrait d'entamer le traitement le plus rapidement possible et d'améliorer le pronostic fœtal.

### 1.2. Gestation physiologique

La durée moyenne de gestation chez la jument est de 11 mois et 11 jours. Néanmoins, la parturition peut se produire entre 320 et 365 jours (Fernando *et al.*, 2017).

### 1.3. Mise en place de la placentation

Après 6 à 7 jours de transit dans l'oviducte (Noakes *et al.*, 2019), l'embryon arrive dans l'utérus dans lequel il va entamer sa phase de migration jusqu'au jour 16 ou 18 (Conley, 2016). Cette phase de migration est permise grâce à la libération par l'embryon de prostanoïdes qui ont un effet sur le muscle lisse de l'utérus. Ce mouvement embryonnaire empêche la lutéolyse due à la libération de prostaglandines F (PGF<sub>2-alpha</sub>) par les cellules endométriales. Dès le jour 10, le conceptus sécrète de l'E2 ainsi que de l'E1 ce qui engendre une production de glycoprotéines et d'utéroferrine par l'utérus. Cependant, la nature exacte du ou des facteurs antilutéolytiques sécrétés par le conceptus reste encore à élucider (Noakes *et al.*, 2019) car, contrairement à la vache, la détection chez les équidés de la production d'interféron-tau par le conceptus équin n'a pas encore été prouvée (Noakes *et al.*, 2019). Si, par contre, la reconnaissance maternelle n'a pas lieu, la jument reviendra en œstrus suite à la lutéolyse (Steven *et al.*, 2011). Entre le 16e et 18e jours, survient la fixation de la vésicule (19-24 mm) au niveau de la base d'une corne utérine. À ce stade, la nutrition de l'embryon se déroule toujours par imbibition et la mise en place du placenta sera plus tardive (Noakes *et al.*, 2019).

À partir du 30e jour de gestation, l'amnios, qui est un repli de mésoderme et d'ectoderme, finit par fusionner et entourer complètement le disque embryonnaire ; ce dernier évoluera en embryon et enfin en fœtus. Au même moment, on observe la formation du chorion (Noakes *et al.*, 2019). Finalement, la dernière membrane fœtale à se former est l'allantoïde. Plus tard, il fusionnera avec le chorion pour former l'allantochorion, ainsi qu'avec l'amnios pour donner l'allantoamnios (Noakes *et al.*, 2019). Par

la suite, un développement progressif du sac allantoïdien se produit et à contrario, la régression du sac vitellin est observée (Bergfelt et Adams, 2011). Vers 28-30 jours, chaque sac occupe la même proportion pour qu'à partir de 31 à 33 jours, le ratio observé initialement soit inversé. Ce n'est qu'à 45 jours de gestation que le sac vitellin est presque complètement remplacé par l'allantoïde (Bergfelt et Adams, 2011).

Vers le 35e jour, à côté des composants non-invasifs de l'allantochorion, des composants invasifs se détachent (Peugnet, 2014). Cellules, qu'on nomme cellules de la ceinture chorionique, envahissent l'endomètre pour former des cupules endométriales vers 32-35 jours de gestation (Noakes *et al.*, 2019). Ces structures sont disposées de manière concentrique à la base de la corne gestante et ont l'aspect d'un cratère. Les cupules endométriales actives commencent à sécréter de la pregnant mare serum gonadotrophine (PMSG) à partir de 35-40 jours et ce jusqu'au 135e jour. Ensuite, elles régressent et disparaissent vers 140 jours (Noakes *et al.*, 2019).

En parallèle, vers le 40e jour, des microvillosités se développent entre l'allantochorion et l'endomètre. Durant 100 jours, de multiples interdigitations se créent avec l'endomètre sur toute la surface de l'allantochorion afin de former ce qu'on appelle des micro-cotylédons. Ces micro-cotylédons font partie du composant trophoblastique non-invasif et constituent le placenta définitif permettant les échanges fœto-maternels (Noakes *et al.*, 2019 ; Peugnet, 2014). Suite à cette formation de membranes fœtales vers 50 jours de gestation, on passe de la période embryonnaire à la période fœtale. Ce passage est marqué par le développement du cordon ombilical, le début de la descente du fœtus entouré de l'amnios vers le plancher du sac allantoïdien ainsi que par le changement du mode de nutrition (Bergfelt et Adams, 2011) ; on passe d'une nutrition par imbibition des sécrétions exocrines des glandes utérines à une nutrition placentaire (Noakes *et al.*, 2019). La jument a une placentation diffuse car les villosités sont distribuées uniformément sur le chorion fœtal. Le chorion est en contact avec l'endomètre sur toute la surface et il n'y a aucune perte de tissu maternel lors de la formation du placenta (Noakes *et al.*, 2019).

#### 1.4. Maintien hormonal de la gestation

##### 1.4.1. *Les progestagènes et la progestérone*

###### 1.4.1.1. Cinétique et sources de production

Après l'ovulation et la formation du *corpus haemorrhagicum* ou du *corpus luteum verum*, ces derniers vont être actifs pendant les 3 premiers mois de gestation et produire de la progestérone. Les concentrations plasmatiques en progestérone augmentent de 7 à 8 ng/mL sur une période de 6 jours jusqu'à 10 ng/mL. Cette concentration est à peu près maintenue à ce niveau pendant les 4 premières semaines de gestation, puis chute transitoirement 28 jours après l'ovulation à 5 ng/mL (Noakes *et al.*, 2019).

Une augmentation ultérieure est due à la présence de corps jaunes accessoires qui sont formés sous l'influence de la PMSG produite par les cupules endométriales afin d'atteindre et de maintenir un plateau de progestérone d'environ 50 à 140 jours. La production de progestérone est maintenue grâce à la persistance de corps jaunes durant quelques semaines (Noakes *et al.*, 2019).

Les cupules endométriales produisent de la PMSG que l'on peut détecter entre 35 et 135 jours mais plus facilement entre 50 et 90 jours. Le pic hormonal est variable selon la jument mais se situe aux alentours de 60-70 jours. La variabilité de la concentration en PMSG est due à la nutrition, la génétique ainsi qu'au milieu utérin de la jument gestante (Conley, 2016 ; Legacki *et al.*, 2016 ; Conley et Ball, 2019). En réponse à la stimulation de la PMSG, on a une augmentation de l'expression lutéale d'enzymes nécessaire à la production de précurseurs de stéroïdes comme le 17  $\alpha$  hydroxyprogestérone

et l'androstènedione. Ces précurseurs fournissent un support supplémentaire pour la gestation, la maturation de l'allantochoirion et le développement de son activité endocrinienne (Conley, 2016). La régression des cupules et la diminution de sécrétion de la PMSG sont aussi associées à la diminution de la progestérone qui, chez certaines juments, devient indétectable dès le 180<sup>e</sup> jour de gestation (Conley, 2016 ; Steven *et al.*, 2011). En résumé, la principale source de progestérone en début de la gestation provient du corps jaune primaire et ensuite des accessoires. En effet, si une ovariectomie maternelle a lieu avant 100 jours de gestation, un avortement s'en suivra car aucune autre source de progestatifs n'existe (Ousey, 2004).

Par contre, les juments ovariectomisées après 100 jours de gestation sont capables de maintenir une gestation car la production des corps jaunes n'est plus essentielle pour son maintien (Steven *et al.*, 2011). De 180 à 200 jours, les concentrations en progestérone sont donc inférieures à 1 ng/mL à cause de la dégénérescence du *corpus luteum verum* et des corps jaunes accessoires et elles le restent jusqu'à environ 300 jours de gestation (Noakes *et al.*, 2019). Suite à cette régression du tissu lutéal, le placenta doit reprendre en charge la production de progestatifs (Steven *et al.*, 2011 ; Noakes *et al.*, 2019).

À partir de la prégnénolone fœtale et de la déhydroépiandrostérone, l'unité fœto-placentaire synthétise la plus grande partie des 5 alpha-prégnanes dont la 5 $\alpha$ -pregnan-20 $\alpha$ -ol-3,20-dione et la 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol-3,20-dione, qui dominent le profil hormonal au cours de la gestation (Conley et Ball, 2019). Tous les progestagènes sont dosables dans la circulation maternelle à partir de 50 jours et subissent une croissance progressive jusqu'à 300 jours de gestation afin de la maintenir (Steven *et al.*, 2011). Un autre puissant agoniste des récepteurs de la progestérone équine intervient, la 5 alpha-dihydroprogestérone (Legacki *et al.*, 2016 ; Conley et Ball, 2019). Cette hormone permet de maintenir la gestation quand il y a absence de tissu lutéal (Conley, 2016). Elle n'est pas produite par le *corpus luteum verum* en tant que tel, mais elle est issue de la progestérone qui est réduite par la 5  $\alpha$ -réductase dans la circulation systémique à partir de la mi-gestation (Chavatte-Palmer *et al.*, 2000 ; Conley, 2016). La 5 alpha-dihydroprogestérone augmente parallèlement à la progestérone jusqu'au 84<sup>e</sup> jour de gestation. Ensuite, lors de la diminution de la concentration en progestérone, elle augmente encore. Pour que, vers 110 jours, elle soit supérieure à la concentration de progestérone et signe le changement lutéo-placentaire. La production n'est donc plus ovarienne mais placentaire. Le pic de la concentration en 5 alpha-dihydroprogestérone est atteint vers 235 jours puis diminue progressivement (Legacki *et al.*, 2016).

Juste avant le poulinage, la progestérone augmente rapidement pour atteindre un pic et diminuer ensuite rapidement à de très faibles concentrations immédiatement après la parturition (Noakes *et al.*, 2019). Les autres progestagènes présentent aussi ce pic *pré-partum*, puis ils diminuent rapidement car ils sont eux-même synthétisés par le placenta et il y a une diminution de l'activité de la 5 alpha-réductase (Legacki *et al.*, 2016 ; Conley et Ball, 2019). Ces changements dans les taux de progestatifs semblent être sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien fœtal (Noakes *et al.*, 2019). En effet, lorsque le cortex surrénalien fœtal se développe et se différencie, les surrénales fœtales commencent à sécréter de la prégnénolone qui sert de précurseur à la synthèse des progestatifs par les tissus utéro-placentaires. Cela explique pourquoi les progestatifs plasmatiques maternels diminuent immédiatement après la mort intra-utérine du fœtus (Noakes *et al.*, 2019). Lorsque le cortex surrénalien est différencié et activé par la montée prénatale d'hormones adrénocorticotropes (ACTH), il passe de la production de prégnénolone à celle de cortisol, qui semble être responsable de la chute précipitée finale du taux plasmatique de progestatifs (Fowden *et al.*, 2008).

Il convient de noter qu'en cas de pathologies placentaires, la prégnénolone ne sera pas convertie en progestagènes. La concentration en prégnénolone sera dès lors augmentée, mais celle-ci pourra faire des réactions croisées avec la progestérone. Il en résultera donc une augmentation importante des

progestagènes et ce avant 310 jours de gestation. Ce dosage de progestagènes est donc utilisé afin de prédire la santé fœtale et placentaire. Cependant, en raison des réactions croisées, aucun seuil de concentrations sériques en progestérone n'est établi pour permettre le diagnostic d'un avortement imminent (Shikichi *et al.*, 2017). De plus, lors d'un stress, de torsion utérine, de colique ou de toute pathologie n'impliquant pas directement le fœtus, la concentration en progestérone n'est affectée que quelques heures, voire jours avant l'avortement (Santschi *et al.*, 1991).

#### 1.4.2. Les œstrogènes

Les œstrogènes font partie des hormones stéroïdes, mais ils présentent un anneau aromatique A ainsi que d'un groupe alcool porté par le 3e carbone (Senger, 2015). Il existe de nombreux œstrogènes. Parmi ceux-ci nous pouvons citer l'E1, l'E2, l'œstriol, l'équiline et l'équilénine (figure 1).

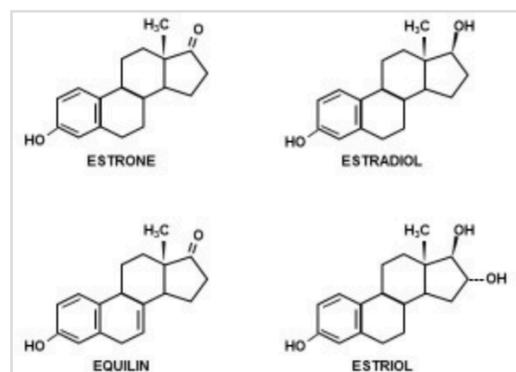


Figure 1 : Structure des principaux œstrogènes (Raeside, 2017).

##### 1.4.2.1. Cascade menant à la production d'œstrogènes

Le 3- $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase permet de convertir la déhydroépiandrostérone en androstènedione puis ce dernier est converti en E1 par l'aromatase ou en testostérone par la 17- $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase. L'E1 peut être convertie par le 17- $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase en E2 dans l'allantochorion (Canisso *et al.*, 2017). La déhydroépiandrostérone subit une 16-hydroxylation. Le produit de la réaction est le 16-hydroxy-déhydroépiandrostérone, précurseur de l'œstriol sécrété par le placenta. L'E2 est produit à partir de déhydroépiandrostérone d'origine maternelle et fœtale. Cette dernière hormone est produite en majeure partie par les gonades fœtales et en plus petite quantité par les glandes surrénales du fœtus (Conley et Ball, 2019) à partir de la prégnénolone d'origine placentaire.

Pour résumer, la déhydroépiandrostérone sert de précurseurs pour la production placentaire de l'E1, l'E2 ainsi que leurs sulfoconjugués (figure 2) tandis que la 7-déhydroépiandrostérone sert de précurseur pour l'équiline, l'équilénine et leurs dérivés.

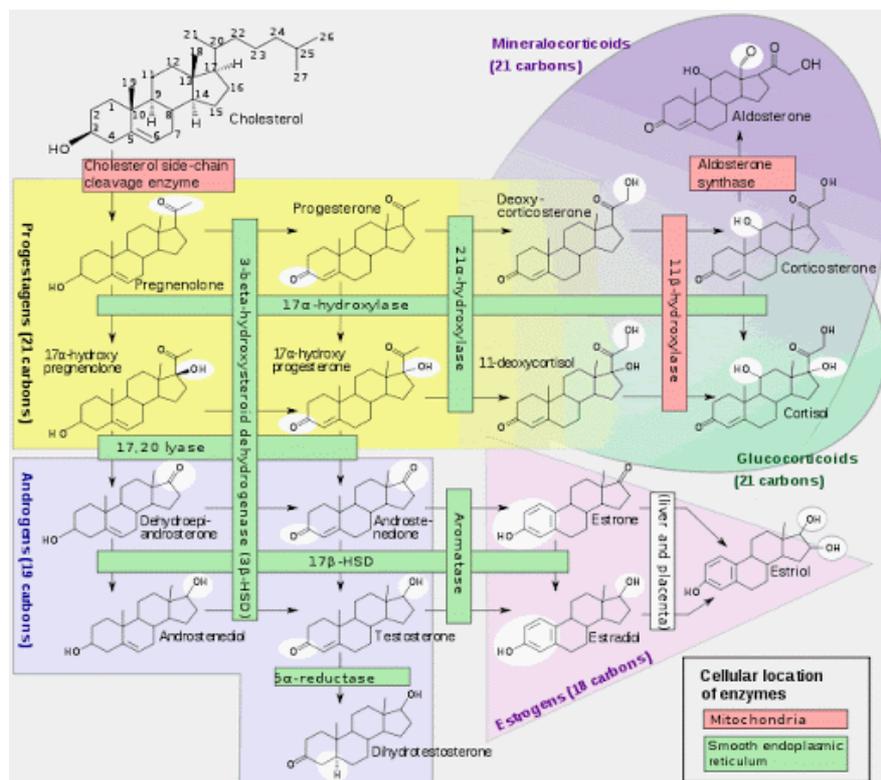


Figure 2 : Ensemble de réactions menant à la formation de différents œstrogènes.

#### 1.4.2.2. Cinétique et sources de production

Tout d'abord, une production embryonnaire temporaire d'œstrogènes (E1, E2 et leurs sulfoconjugués) est observée entre le 12e et 20e jour de gestation. Les œstrogènes se retrouvent dans le liquide du sac vitellin (Conley, 2016). Cette production œstrogénique participerait au signal de reconnaissance de la gestation (Noakes *et al.*, 2019), comme chez la truie (Senger, 2015).

Passé ce délai, vers le 35e jour, la PMSG a à la fois une activité folliculostimulante et lutéinisante en association avec les gonadotrophines hypophysaires. Elle stimule le développement folliculaire (Conley, 2016), la formation de corps jaunes accessoires et régule la stéroïdogénèse lutéale (Daels *et al.*, 1998). Sous cette stimulation, le *corpus luteum verum* est aussi capable de produire de l'E1S. Les corps jaunes prennent le relai et assurent la production œstrogénique afin d'atteindre un plateau entre 40 et 60 jours avec des valeurs supérieures (environ 3 ng/mL d'œstrogènes totaux) (Noakes *et al.*, 2019) de celles qui se produisent avant l'ovulation (Conley, 2016).

Après le 60e jour de gestation, la production d'œstrogènes est essentiellement assurée par le placenta et le fœtus (Terqui et Palmer, 1979 ; Steven *et al.*, 2011) et la concentration œstrogénique dépasse celle observée durant l'œstrus (Cox, 1975). La production placentaire est permise à partir de précurseurs de l'E1, l'E2 alpha et beta ainsi que l'équiline et l'équilénine (Ousey, 2004 ; LeBlanc, 2010 ; Murase *et al.*, 2015 ; Conley, 2016 ; Shikichi *et al.*, 2017 ; Esteller-Vico *et al.*, 2017). Entre 150 et 280 jours, les concentrations œstrogéniques évoluent en parallèle avec la croissance et l'activité des gonades fœtales qui sont responsables de la production des précurseurs androgéniques tels que la déhydroépiandrostérone. Cette dernière hormone est convertie en œstrogènes par le placenta. Une certaine quantité d'androgènes échappe au métabolisme placentaire et se retrouve donc dans la circulation sanguine maternelle (Conley, 2016).

En fonction du type d'œstrogènes, les dosages immunologiques montraient des pics à partir du 5 et 6e mois pour l'E1S et à partir du 7 et 8e mois pour l'équiline (Cox, 1975 ; Conley, 2016 ; Ousey, 2004).

Une diminution progressive est ensuite observée jusqu'à la parturition (Murase *et al.*, 2015). Cependant, il existe d'énormes différences individuelles au niveau des concentrations en œstrogènes mesurées avec des techniques immunologiques chez les juments gestantes (Murase *et al.*, 2015).

Contrairement à la vache, la truie et la brebis, les concentrations plasmatiques d'œstrogènes diminuent plutôt que d'augmenter chez la jument durant les 100 derniers jours de gestation, atteignant des niveaux relativement bas lors de la mise-bas. Cependant, cela reflète en grande partie le déclin de l'E1 et des œstrogènes spécifiques à l'espèce, l'équiline et l'équilénine car les concentrations d'E2 restent assez constantes (Noakes *et al.*, 2019). Cette diminution d'œstrogènes produits par le placenta provient de la baisse de concentration plasmatique d'androgènes produits par les gonades fœtales et est associée à la régression de la taille gonadique durant les derniers mois de gestation (Ousey, 2004 ; Legacki *et al.*, 2016 ; Raeside, 2017).

Malgré une diminution de la concentration en œstrogènes totaux, des œstrogènes spécifiques tels que l'E1, l'E1S et l'E2  $\alpha$  et  $\beta$  permettent la production de prostaglandines, d'ocytocine et de récepteurs à l'ocytocine qui à leur tour vont initier le début de l'activité myométriale (Ousey, 2004). Finalement, au cours des dernières 24 à 48 heures avant la mise-bas, les concentrations maternelles d'E2 doublent à nouveau (Noakes *et al.*, 2019 ; Canisso *et al.*, 2017). Tandis que, selon Conley (2016), il n'y a pas d'E2 détectable avant la parturition même avec une haute fréquence d'échantillonnage.

#### 1.4.2.3. Rôle des œstrogènes

Le rôle physiologique des œstrogènes reste inconnu durant la gestation et de nombreuses divergences existent chez les auteurs en fonction des avancées scientifiques.

Selon Pashen et ses collaborateurs (1979), le maintien de la gestation, la lactogénèse et la parturition ne nécessitent pas la présence d'œstrogènes. Par contre, ils sont essentiels pour le développement fœtal grâce à leur action sur le flux sanguin placentaire et utérin, comme chez les babouins, chez lesquels les œstrogènes stimulent l'angiogénèse placentaire au début de la gestation en augmentant l'expression des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Niklaus *et al.*, 2003 ; Albrecht *et al.*, 2004 ; Robb *et al.*, 2004 ; Robb *et al.*, 2007).

Selon Haneda et Ball (données non publiées), les juments traitées au létrozole, un inhibiteur 5 alpha-aromatase, à partir de 30-120 jours de gestation montrent une diminution des VEGF. Une synthèse inadéquate d'œstrogènes tôt dans la gestation peut donc avoir des répercussions sur le flux sanguin et le bien-être fœtal. Plus tard, l'angiogénèse est moins active et la diminution d'œstrogènes ne serait donc pas problématique.

L'étude menée par Esteller-vico et ses collaborateurs (2017) montre qu'aucune modification du flux sanguin utérin, de l'épaisseur de l'unité fœto-maternelle, de la durée de gestation, ni même une diminution de la viabilité néonatale n'est associée à l'inhibition de la production d'œstrogènes à partir de 240 jours de gestation à l'aide du létrozole. Cette inhibition n'est pas totale (90%), il se peut donc que la concentration œstrogénique totale reste suffisante pour maintenir un certain flux sanguin utérin.

Le seul effet constaté suite à l'absence d'œstrogènes durant le dernier trimestre est une diminution du poids à la naissance des poulains issus de juments traitées avec le létrozole. Les œstrogènes jouent donc un rôle dans la croissance fœtale, mais probablement indépendamment de la régulation du flux sanguin utérin. Il se peut que ce soit le létrozole lui-même qui soit responsable de cette modification de croissance fœtale (Esteller-vico *et al.*, 2017).

Les œstrogènes peuvent aussi être utilisés comme marqueur de compromis fœto-placentaire. En effet, la concentration en E1S dosée par des immuno-assays diminuait fortement après l'induction de l'avortement (Kasman *et al.*, 1988). Selon Canisso et ses collaborateurs (2017), la prédiction d'anomalies placentaires est possible au début de la gestation car elles sont accompagnées d'une diminution de la concentration périphérique en E2. Plus tard dans la gestation, l'E1S circule à une plus grande concentration et a un temps de demi-vie plus long, rendant cette prédiction moins fiable (Canisso *et al.*, 2017 ; Legacki *et al.*, 2019).

#### 1.4.2.4. Méthodes de dosage des œstrogènes

Les matériaux biologiques utilisables pour un diagnostic de gestation utilisant les œstrogènes chez la jument sont les fèces (Steven *et al.*, 2011), le sérum (Esteller-Vico *et al.*, 2017) et l'urine (entre 150 et 300 jours de gestation pour une détection fiable et précise par une méthode chimique (Noakes *et al.*, 2019)). Le dosage immunologique des œstrogènes totaux dans le sang est un bon indicateur non invasif de bien-être fœtal (LeBlanc, 2010), mais il peut aussi être utilisé comme moyen de diagnostic de gestation (Conley et Ball, 2019). En effet, selon les concentrations en œstrogènes totaux obtenues par dosages immuno-enzymatiques, des seuils sont décrits. Entre 500 et 800 ng/mL, le fœtus est compromis, supérieur à 1000 ng/mL entre le jour 150 et 280, il est considéré comme normal et inférieur à 500 ng/mL, le fœtus est dès lors fortement compromis voire mort (LeBlanc, 2010). Cette observation suggère que l'inflammation affecte négativement la production placentaire œstrogénique et démontre un stress ou une hypoxie du fœtus qui, dès lors, n'est plus capable de fournir les précurseurs des œstrogènes (LeBlanc, 2010 ; Steven *et al.*, 2011 ; Legacki *et al.*, 2016 ; Conley et Ball, 2019). La probabilité de survie du nouveau-né avec un taux d'œstrogènes dans les normes après le jour 201, et ce jusqu'à la parturition, est supérieure à 96% (Shikichi *et al.*, 2017).

Le dosage radio-immunologique (RIA), la méthode immuno-enzymatique (ELISA) et le dosage immunologique micro-particulaire à chimiluminescence (CMIA) sont couramment utilisés pour le dosage des différents œstrogènes en médecine équine. Cependant, de nombreuses variations dans les dosages hormonaux avec ces techniques existent. En effet, le manque de précision et de standardisation empêche les comparaisons et l'établissement de valeurs seuils pour les hormones rencontrées durant la gestation chez les juments (Satué *et al.*, 2011). En fonction de la technique utilisée, les valeurs obtenues peuvent être multipliées par 10. Par exemple, selon la méthode radio-immunologique de Satué et collaborateurs (2011), la concentration de l'E1S est aux alentours de 40 ng/mL à 9 mois tandis que la technique ELISA de Esteller-Vico (2017) et de Canisso et collaborateurs (2017) a obtenu des valeurs entre 600 et 800 ng/mL (Satué *et al.*, 2011 ; Esteller-Vico *et al.*, 2017 ; Canisso *et al.*, 2017).

Pour pallier ce manque de spécificité et de précision, la LC-MS permet, quant à elle, d'acquérir un résultat plus sensible ainsi que d'identifier et de doser simultanément plusieurs composés (Conley, 2016 ; Conley et Ball, 2019 ; Dufour *et al.*, 2021).

### 1.5. Placentite

Pour que la gestation se déroule bien, il est nécessaire d'avoir un contact étroit utéro-placentaire afin d'avoir une optimisation de la diffusion de nutriments, d'oxygène et de déchets entre la jument et son poulain (Bucca *et al.*, 2005).

Chez les juments, le taux d'avortement s'élève de 5 à 15% et l'étiologie est établie dans moins d'un cas sur cinq. Les causes sont multiples, mais la plus fréquemment rencontrée est l'affection ascendante bactérienne et/ou fongique de l'utérus et du placenta : la placentite. Elle est caractérisée par un décollement précoce ou un épaississement du placenta au niveau de la zone cervicale aussi appelée étoile cervicale, ce qui engendre la perte de ce contact et par conséquent, limite les échanges fœto-maternels (Campos *et al.*, 2017). *Streptococcus equi zooepidemicus* est la bactérie la plus souvent isolée. Ensuite, viennent : *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Leptospira spp.*, *Enterobacter spp.*, *Alpha haemolytic streptococci*, *Staphylococcus spp.* ... (Campos *et al.*, 2017).

Il existe des signes cliniques associés à la placentite, tels que des écoulements vulvaires, le déclenchement prématuré de la lactation, mais ceux-ci ne sont exprimés que dans de rares cas et tardivement (Campos *et al.*, 2017). La confirmation finale du diagnostic de placentite est permise grâce à un examen macroscopique de l'allantochorion, l'histopathologie et la culture bactérienne positive (Renaudin *et al.*, 1997). Les juments ayant eu une placentite sont plus à risque d'en développer une seconde fois lors des gestations suivantes et sont donc à surveiller de très près à partir du 7<sup>e</sup> mois de gestation. Un facteur de risque important menant au développement d'une placentite est la mauvaise conformation vulvaire, une vulvoplastie serait donc recommandée afin de limiter la réapparition de cette infection (LeBlanc, 2010).

Un moyen très efficace, accessible, peu invasif et précoce de diagnostic est l'échographie transrectale (Morris *et al.*, 2007). Cette méthode de diagnostic permet une évaluation quantitative et qualitative très fiable de l'intégrité et de l'épaisseur de l'unité fœto-maternelle (Bucca, 2006). Les mesures de l'unité fœto-maternelle sont influencées par le stade de gestation, la race, mais pas par l'âge de la jument (Campos *et al.*, 2017). De plus, de petites variations d'épaisseur de l'unité utéro-placentaire entre races peuvent exister (tableau I).

Selon Fernando et collaborateurs (2017), la capacité de distinguer les juments saines des juments souffrant de placentite est plus aisée quand la gestation est avancée. En effet, entre les jours 210 et 240 de gestation, aucune différence significative n'est visible tandis que, plus on est proche du moment de parturition, entre 270 et 300 jours par exemple, plus les différences sont significatives et ces mesures vont permettre de prédire l'issue de la gestation. Cependant, tout épaississement ne signifie pas que la jument souffre de placentite (Campos *et al.*, 2017). En effet, les plus grandes mesures d'unités fœto-maternelles ne correspondent pas forcément aux placentas les plus épais *post-partum* (Renaudin *et al.*, 1997), et cette différence peut être associée à la technique de mesure. De plus, à l'échographie transrectale, une corne non gestante peut présenter de nombreux replis et ainsi donner une apparence plus épaisse, alors que celle-ci est totalement normale (Kimura *et al.*, 2018). Finalement, Sheerin et collaborateurs (2003) ont démontré que seulement 60% des juments infectées expérimentalement montrent des signes échographiques de placentite.

Tableau I : Évolution de l'épaisseur de l'unité utéro-placentaire en fonction du mois de gestation entre différentes races :

Race	42 Mangalarga Marchador	7 Quarter horse, 1 American Paint horse, 1 Pur-sano	11 Ponevs	107 Pure race Esosonole	37 chevaux de trait	108 Pur-s ano	15 chevaux à sang-cha ud	80 demi-sano	20 Arabes	63 Criollo
Gestation										
1 mois										
2 mois										
3 mois										
4 mois		3,98								
5 mois	4,27 +/-0,81	3,58								
6 mois	4,4 +/- 0,84	3,84						4.7 ± 0.2	6,3	
7 mois	4,76 +/-0,76	3,91		4,83	7,08			5.0 ± 0.5	5	4,02
8 mois	5,22 +/-1,12	4,33		6,12	8,35			5.2 ± 0.8	7,7	5,17
9 mois	5,74 +/-1,24	4,38	4,7	7,41	9,54	5,5		7.7	7,9	4,87
10mois	6,22 +/-1,40	5,84	5,6	10,45	12,34	7,1	8,8	8.3 ± 2.59	8,4	6,53
11mois		7,35	6,3		13,19	8,5	9,7	9.56 ± 2.42		7,3
12mois		9,52	5,7		13,31			15.7 ± 5.6		

Valeurs en millimètres, Intervalle de confiance de 95%.

(Renaudin *et al.*, 1997 ; Barnes *et al.*, 2005 ; Bucca *et al.*, 2005 ; Colón, 2008 ; Souza *et al.*, 2010 ; Bailey *et al.*, 2012 ; Coutinho da Silva *et al.*, 2013 ; Campos *et al.*, 2017 ; Requena *et al.*, 2017 ; Kimura *et al.*, 2018)

D'autres moyens de diagnostic de la placentite existent comme la mesure du sérum amyloïde A, un marqueur inflammatoire qui n'est pas spécifique de la placentite ; c'est la raison pour laquelle elle n'est pas utilisée couramment (Canisso *et al.*, 2017). Il est aussi possible de doser les œstrogènes totaux et l'EIS (Morris *et al.*, 2007). Le dosage de cette dernière hormone n'est, par contre, pas précoce pour la détection de placentite (Steven *et al.*, 2011) et les valeurs obtenues avec les dosages immunologiques ne sont pas comparables entre équipes. Aucune de ces méthodes ne diagnostique avec précision le compromis fœto-placentaire si elles sont utilisées seules ; cependant, la combinaison de deux techniques ou plus peut améliorer les taux de détection (Morris *et al.*, 2007).

Toutefois, la production d'hormones fœto-placentaires est un bon moyen d'évaluation de la santé fœtale, placentaire et un outil de détection anticipée de gestation compromise (Shikichi *et al.*, 2017). Cependant, de nombreuses variations dans les dosages hormonaux avec les techniques immunologiques existent. En effet, le manque de précision et de standardisation empêche les comparaisons et l'établissement de valeurs seuils pour les hormones de la gestation chez les juments (Satué *et al.*, 2011).

Cependant, il est important d'émettre un diagnostic le plus précocement possible. En effet, cela permettra d'augmenter la chance d'avoir un traitement fructueux et la délivrance d'un poulain vivant à la naissance (Bailey *et al.*, 2012). Pour pallier à ce manque de spécificité et de précision, la LC-MS pourrait permettre d'acquérir des résultats plus fiables (Conley, 2016 ; Conley et Ball, 2019 ; Dufour *et al.*, 2021).

## 1.6. Buts de l'étude

Le but majeur de cette étude est de décrire l'évolution des principaux œstrogènes durant la deuxième moitié de la gestation chez la jument. Les œstrogènes sélectionnés sont l'E2, l'E1 et l'E1S. Les échantillons seront analysés à l'aide d'une technique de LC-MS permettant de décrire l'évolution des différents œstrogènes pendant la gestation grâce à une méthode de référence.

L'évolution des différents œstrogènes sera évaluée dans le temps pour identifier les pics de production.

Un autre but de l'étude est de comparer l'évolution des concentrations en œstrogènes chez les juments gestantes saines entre races : pure race espagnole (PRE) et demi-sang (DS).

Les valeurs obtenues chez les cas de placentite observés durant cette étude seront comparés aux normes décrites durant ce travail.

## **2. Matériels et méthodes**

### 2.1. Conditions d'élevage

L'étude a été menée dans deux élevages de la province du Luxembourg. Un total de 26 juments font partie de l'étude. Parmi celles-ci, 11 juments gestantes sont de race DS et les 15 autres sont de race PRE. Les juments étaient élevées au box ainsi qu'au pré durant toute l'année et elles étaient toutes cliniquement saines. Toutes ont été évaluées mensuellement à partir de 4 mois de gestation prenant en compte la date d'ovulation comme point de départ et ce jusqu'au moment du poulinage. Lors de chaque évaluation, un échantillon de sang sur tube sec était pris afin d'y doser les œstrogènes (l'E2, l'E1 et l'E1S) et une échographie transrectale était réalisée pour évaluer l'unité fœto-maternelle. Des dosages ont aussi été réalisés chez trois juments présentant une placentite (2 DS et 1 PRE).

### 2.2. Évaluation échographique des unités fœto-maternelles

Une fois par mois jusqu'à la parturition, une évaluation échographique transrectale était réalisée pour chaque jument participant à l'étude. À l'aide d'un échographe portable EXAPad mini TM (IMV imaging, Angoulême, France), équipé d'une sonde linéaire permettant d'ajuster la fréquence entre 7,5 à 10 MHz, les juments ont été échographiées dans un travail, sans sédation.

L'évaluation transrectale de l'utérus gravide a été effectuée selon la technique décrite par Renaudin et collaborateurs (1997) et a permis d'observer la partie la plus caudale de l'unité fœto-maternelle. Les mesures d'épaisseur de ces unités utéro-placentaires ont été relevées le plus proche du col de l'utérus, crânialement à l'apex de la vessie, là où le placenta est présent et où l'on retrouve le moins de replis.

Une fois qu'une image optimale était obtenue, trois mesures étaient réalisées à différents endroits entre un vaisseau utérin et les liquides fœtaux.

Toutes les juments présentant une anomalie lors des visites telle qu'une hétérogénéité, un début de décollement placentaire ou une mesure de l'unité fœto-maternelle s'écartant des valeurs de référence, ont quant à elles été évaluées à un intervalle de 15 jours afin de détecter le plus précocement possible une placentite. Dès qu'une anomalie échographique était constatée, les concentrations hormonales obtenues sur la jument n'étaient plus utilisées pour la description des courbes physiologiques.

### 2.3. Technique de prélèvement et de conservation des échantillons sanguins

Après chaque examen échographique du placenta, un échantillon sanguin de 9 mL est récolté une fois par mois pour chaque jument enrôlée dans l'étude sur un tube sec cat sérum clot activator, par ponction au niveau de la veine jugulaire gauche à l'aide d'un vacutainer et d'une aiguille 21G. Les tubes, ensuite, sont centrifugés pendant 15 minutes à 1500 tours par minute (Hettich zentrifugen EBA 200 TM, Tuttlingen, Allemagne). Les échantillons sont ensuite conservés au congélateur à une température de -20 degrés Celsius jusqu'à l'analyse par LC-MS.

### 2.4. Technique d'analyse à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée au spectromètre de masse

La spectrométrie a été réalisée selon l'article de Dufour et collaborateurs (2021). La limite inférieure de quantification (LLOQ) à l'aide de cette technique de mesure pour l'E1S, l'E1 et l'E2 est respectivement de 0,5 ng/mL, 2 pg/mL et de 2 pg/mL.

## 2.5. Évaluation des placentas

Une photographie de chaque placenta est envoyée par l'éleveur après chaque poulinage afin de pouvoir réaliser une inspection visuelle de la face endométriale de l'allantochoion. Ceci permettrait de mettre en évidence toute anomalie placentaire telle qu'une coloration foncée correspondant à de la congestion et/ou une augmentation de l'épaisseur de ce dernier.

Les juments n'ayant aucune anomalie visuelle de leur placenta ont été incluses dans le groupe de juments ayant une gestation physiologique tandis que, les juments présentant une image de placente ont été incluses dans le groupe des juments avec placente. Celles-ci ont été exclues de la première partie de l'étude, c'est-à-dire la description physiologique des concentrations œstrogéniques chez les juments.

## 2.6. Méthodes statistiques

Afin de déterminer si les données sont réparties selon la loi normale, un test de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque le P était inférieur à 0,05.

Les mesures de l'épaisseur de l'unité fœto-maternelle sont distribuées selon la loi normale. Les valeurs moyennes ainsi que la déviation standard des données ont été déterminées. Ensuite, une comparaison de moyennes (ANOVA) a été réalisée en fonction des différents mois de gestation et des races.

Les données ne suivant pas la loi normale, les courbes de concentration en œstrogènes en fonction du mois de gestation ont été établies en utilisant des comparaisons multiples de Kruskal Wallis. Un test de Mann Whitney était utilisé pour déterminer les différences de concentrations entre races au même mois. Les données ont été représentées graphiquement en utilisant les médianes et quartiles calculés pour chaque mois de gestation échantillonné.

La corrélation entre les différents œstrogènes a été exprimée par le coefficient de corrélation de Spearman.

### 3. Résultats

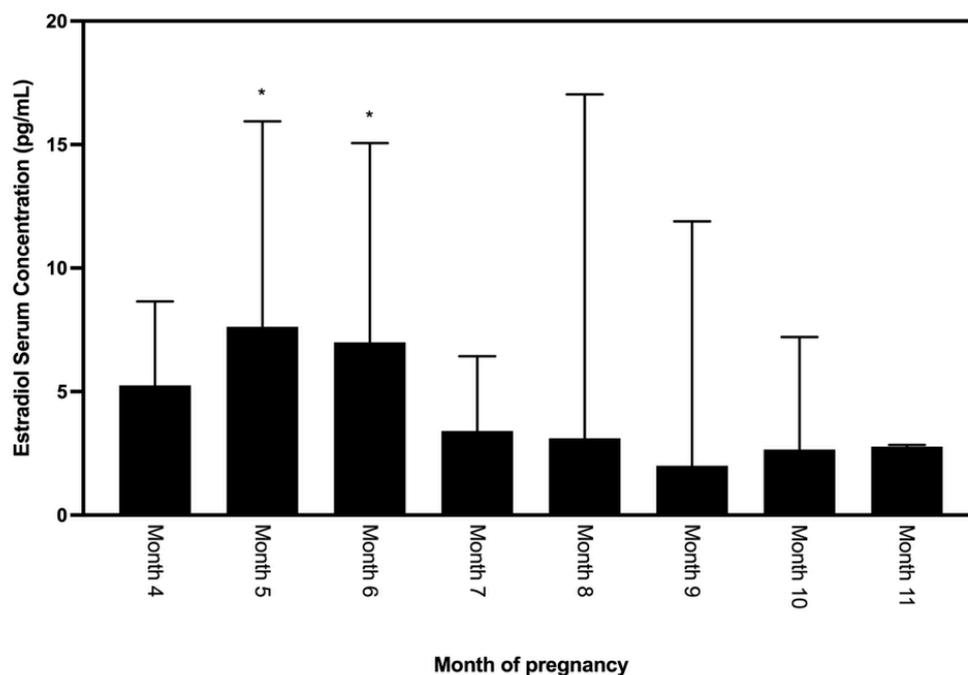
Un total de 22 juments de race DS ou PRE ont été enrôlées pour la description des courbes physiologiques. Toutes ont été évaluées mensuellement à partir de 4 mois de gestation. La durée de gestation observée dans le groupe des juments saines s'étend de 315 à 357 jours de gestation. Toutes ces juments ont mis au monde un poulain cliniquement sain.

Au cours de l'étude, 4 juments ont été exclues. La première jument (PRE) a été exclue à 9 mois de gestation pour les 2 premiers critères cités. L'épaisseur de son unité fœto-maternelle à ce moment était de 8,53 mm. De plus, sa durée de gestation était la plus longue parmi toutes les juments enrôlées, soit 357 jours. La seconde exclue était de race DS, à 8 mois, pour un placenta hétérogène et une mesure de 7,76 mm pour son unité fœto-maternelle. Ces 2 juments ont été mises dans le groupe des placentites. Celles-ci ont été traitées jusqu'à 3 jours avant la date de poulinage prévue avec de l'altrénogest et du triméthoprime-sulfamides par voie orale. Une autre jument DS a été hospitalisée en clinique pour placentite confirmée à l'échographie et des échantillons ont été collectés à 8 mois. La dernière jument s'est fait exclure pour un poulain faible à la mise-bas.

À l'aide de la LC-MS, l'évolution de l'E1, l'E2 et l'E1S pendant la gestation a été décrite.

L'E2 atteint son pic à 5 mois avec une concentration de 7,625 pg/mL. La valeur la plus basse est de 2 pg/mL à 9 mois ; cette valeur est très proche de la LLOQ de la technique de mesure qui est de 2 pg/mL. Entre 5 et 9 mois, une diminution progressive se réalise en restant au dessus de la LLOQ. Ensuite, la concentration en E2 ré-augmente légèrement avant la parturition pour atteindre un second plateau à 11 mois à 2,775 pg/mL (figure 3).

Evolution de la concentration en œstradiol (pg/mL) entre 4 et 11 mois de gestation

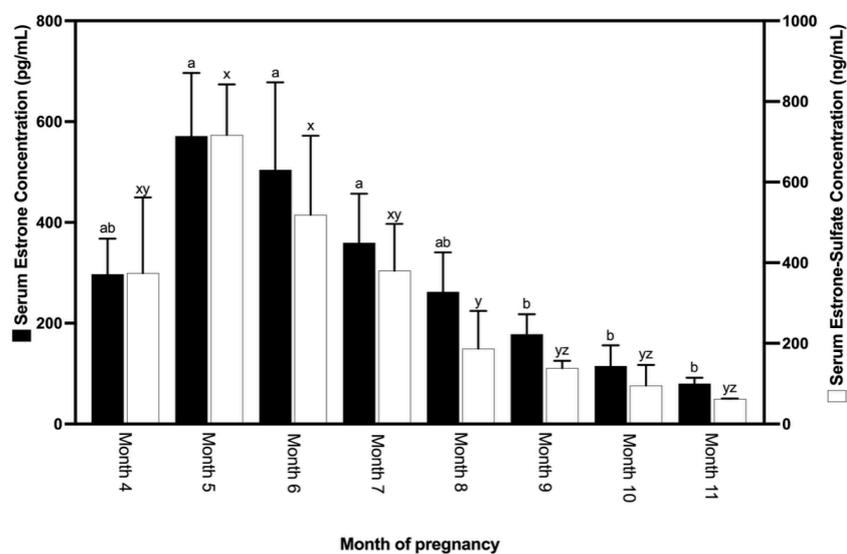


*Figure 3 : Évolution de la concentration en œstradiol (pg/mL) entre 4 et 11 mois de gestation. Les données sont représentées par leur médiane et leur quartile. \* : indique une différence significative avec les autres médianes.*

Les concentrations en E1 à sa valeur pic (571 pg/mL à 5 mois) sont significativement différentes des valeurs obtenues pour la fin de la gestation. La concentration la plus basse (80,22 pg/mL) pour cette hormone est obtenue en toute fin de gestation, c'est-à-dire à 11 mois. Celle-ci est largement supérieure à la LLOQ qui est également de 2 pg/mL pour l'E1 (figure 4).

En ce qui concerne l'E1S, la valeur pic de 573,6 ng/mL est obtenue à 5 mois de gestation. Cette concentration est significativement différente des valeurs obtenues à partir de 8 mois (149,7 ng/mL,  $P < 0,0001$ ) et ce jusqu'à la parturition avec un P variant entre  $< 0,0001$  pour le 9 et 10e mois et 0,0032 pour le dernier mois de gestation. La valeur minimale est de 49,74 ng/mL à 11 mois de gestation, soit toujours bien supérieure à la LLOQ (figure 4).

Evolution de la concentration en œstrone (pg/mL) et en œstrone sulfate (ng/mL) entre 4 et 11 mois de gestation



*Figure 4 : Évolution de la concentration en œstrone (pg/mL) et en œstrone sulfate (ng/mL) entre 4 et 11 mois de gestation. Les données sont représentées par leur médiane et leur quartile. Des lettres différentes marquent une différence significative ( $P$  valeur  $< 0,0001$ , test de Kruskal Wallis)*

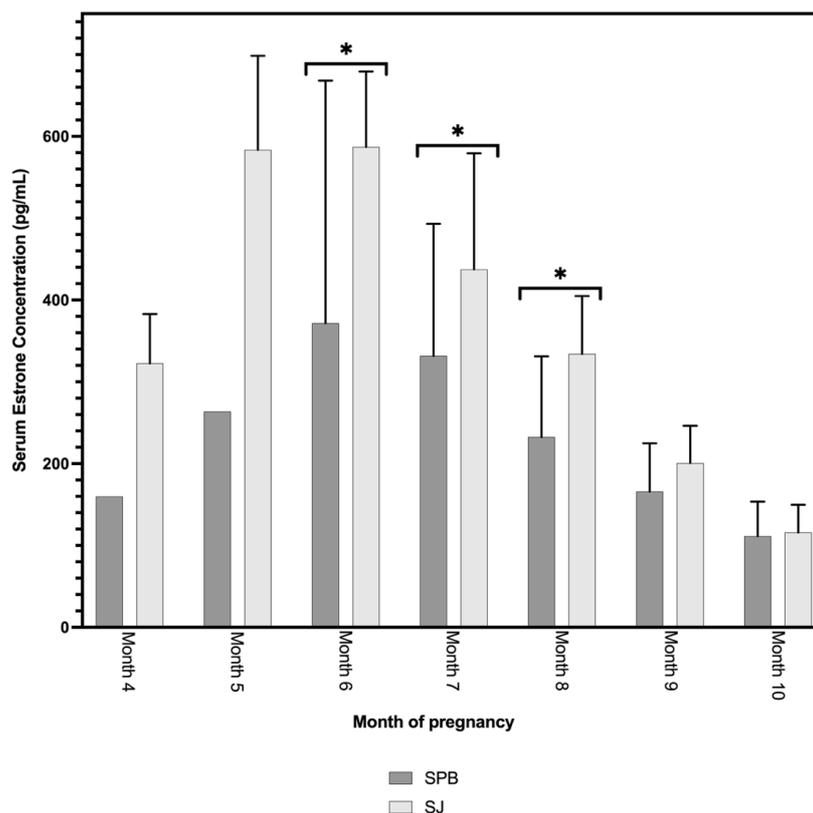
L'évolution entre l'E1 et l'E1S n'est pas totalement parallèle durant leur déclin progressif. En effet, l'E1S diminue plus rapidement et proportionnellement de façon plus importante que l'E1 (figure 4).

Une corrélation importante entre l'E1 et l'E1S est présente ( $P < 0,0001$  ;  $r = 0,85$ ). On observe aussi une corrélation entre l'E2 et l'E1 ( $P < 0,0001$  ;  $r = 0,6976$ ) ainsi qu'avec l'E1S ( $P < 0,0001$  ;  $r = 0,6388$ ).

Les concentrations en E2 sont plus importantes pour les juments DS (7,4 pg/mL) comparés au PRE (3,27 pg/mL) à 6 mois ( $P = 0,0338$ ). Une autre différence significative dans les taux d'E2 a été observée à 9 mois, mais de nombreuses valeurs étaient sous le LLOQ, ce qui limite l'interprétation de ce résultat.

Des différences significatives sont observées entre 6 et 8 mois avec des valeurs médianes de 587,12 pg/mL en E1 pour les DS (SJ ; ShowJumping horse) et de 306,45pg/mL pour les PRE (SPB ; Spanish Pure Breed) à 6 mois (figure 5).

Evolution de la concentration en œstrone (pg/mL) entre 4 et 10 mois de gestation en fonction de la race



*Figure 5 : Évolution de la concentration en œstrone (pg/mL) entre 4 et 10 mois de gestation ainsi qu'en fonction de la race.*

*Les données sont présentées par leur médiane ainsi que leur quartile. SPB : Spanish purebred. SJ : Show Jumping. \* : indique une différence significative entre races pour les concentrations médianes en E1 au même mois de gestation.*

En ce qui concerne la mesure de l'épaisseur de l'unité fœto-maternelle, celle-ci montre une évolution croissante et progressive tout au long de la gestation. La valeur minimale est de 4,34 +/- 0,56mm à 4 mois de gestation et l'épaisseur maximale est atteinte à 11 mois avec 8,39 +/- 2,02mm. Cependant, aucune différence significative entre races n'a été relevée ( $P > 0.05$ ).

Chez les 3 juments atteintes de placentite, les concentration en E1S étaient de 172 ng/mL et de 38 ng/mL à 8 mois chez les DS et de 80 ng/mL à 10 mois pour les PRE (valeur chez les juments saines à 8 et 10 mois : 149,7 ng/mL et 49,74 ng/mL).

Les DS avec placentite avaient une concentration en E1 de 270 et de 95 pg/mL (valeur médiane des juments saines 335 pg/mL). Pour les PRE, la valeur observée chez la jument présentant une placentite s'élève à 147 pg/mL contre 113 pg/mL chez les juments saines.

#### 4. Discussion

Le but majeur de cette étude était de décrire l'évolution des principaux œstrogènes durant la deuxième moitié de la gestation et de les comparer entre les différences entre races en utilisant la LC-MS.

Depuis plus d'une vingtaine d'années, l'E2, l'E1 et l'E1S sont étudiés à l'aide d'immunodosages mais de nombreux points d'ombre persistent quant à leur cinétique (Cox, 1975 ; Terqui et Palmer, 1979 ; Santschi *et al.*, 1991, Conley, 2016).

En effet, les immuno-assays ne sont pas aussi spécifiques que la LC-MS pour la différenciation de composés structurellement similaires tels que nos œstrogènes. Selon les fabricants de kits immunologiques de dosage de l'E1S, la réactivité croisée observée avec l'œstrone est de 7,8% pour l'ELISA et de 4,9% pour les dosages RIA (Dufour *et al.*, 2021).

De plus, avec une technique de RIA pour l'E1S, Satué *et al.* (2011), ont observé une augmentation significative jusque 6 mois de gestation (pic : 131,7 +/- 26,08 ng/mL), suivie d'une diminution progressive avec une concentration de 40 ng/mL à 9 mois de gestation. Dans une autre étude, des valeurs d'E1S entre 600 et 800 ng/mL étaient observées au même stade de gestation avec un ELISA (Canisso *et al.*, 2017 ; Esteller-Vico *et al.*, 2017).

C'est pour cette raison qu'il a été décidé de les décrire selon une nouvelle technique de mesure validée et plus standardisée (Dufour *et al.*, 2021), la LC-MS, afin de déterminer des valeurs de référence. Dotée de multiples avantages, la LC-MS est une méthode d'analyse permettant de mesurer plusieurs stéroïdes simultanément, avec un haut degré de précision, de sensibilité et de spécificité, enregistrée pour l'espèce équine (Dufour *et al.*, 2021).

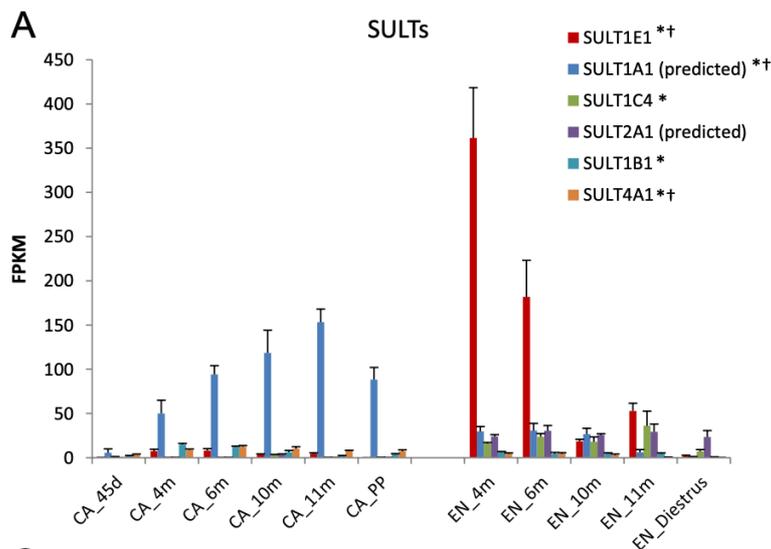
Avec notre méthode de LC-MS (Dufour *et al.*, 2021), le pic d'E1S est observé à 5 mois de gestation (573,6 ng/mL). L'ensemble de ses résultats prouve à quel point une nouvelle technique de mesure plus standardisée était nécessaire afin de pallier ces disparités de concentrations.

Cependant, selon Legacki (2019), le pic de concentration observé en LC-MS de l'E1S est de 50 µg/mL à 6,5 mois de gestation. Cette valeur au pic est très différente de celles observées dans cette étude, mais elle a été obtenue sur seulement 6 juments de la même race. De plus, ces divergences peuvent aussi s'expliquer par une différence dans la préparation d'échantillon (Dufour *et al.*, 2021) ou encore par différents effets, comme la race, la nutrition des juments, ou d'autres non encore décrits...

Il convient par ailleurs de noter que les valeurs obtenues pour les concentrations œstrogéniques durant cette étude à l'aide de la LC-MS sont toujours comprises dans l'intervalle de valeurs également obtenu par les dosages immunologiques depuis plus de 20 ans.

Une corrélation importante a aussi été observée entre l'E1 et l'E1S ( $r = 0,85$ ) au cours de cette étude. Cependant, l'évolution des concentrations de ces 2 hormones n'est pas complètement parallèle, l'E1S diminuant nettement plus rapidement et de façon plus importante que l'E1 (figure 4).

La justification de cette divergence peut être associée à la capacité de sulfatation placentaire de l'E1 en E1S chez la jument gestante. En effet, l'expression au niveau de l'endomètre de l'enzyme de sulfatation SULT1E1 est à son maximum vers 4 mois de gestation, pour ensuite diminuer significativement à partir de 6 mois quand l'allanto-chorion prend le relais de son expression (figure 6 : Loux *et al.*, 2020).



*Figure 6 : Expression relative des transcrits de la famille SULT impliqués dans la conjugaison des stéroïdes pendant la gestation (Loux et al., 2020).*

*SULT, sulfotransférase ; CA, chorioallantoïde ; EN, endomètre ; PP, post-partum ; d, jour ; m, mois. Les barres d'erreur représentent la déviation standard. Les différences significatives ( $P < 0,05$ ) au cours de la gestation sont indiquées par \* pour le chorioallantoïde et † pour l'endomètre.*

La diminution plus rapide de l'E1S observée en LC-MS pourrait donc être associée à la cinétique de l'expression ces deux sulfotransférases au niveau de l'endomètre et de l'allantochorion.

Une cinétique divergente a également été relevée entre races pour les œstrogènes non sulfoconjugués que sont l'E1 et l'E2. En effet, les DS présentent des concentrations en œstrogènes non conjugués significativement plus élevées que les PRE à 6 mois pour l'E2 et entre 6 et 8 mois pour l'E1.

Cet effet de la race peut être lié à des transcrits responsables de la synthèse, de la conjugaison, du transport et de la signalisation des hormones stéroïdiennes.

Le premier est une aromatasase (CYP19A1) qui permet la transformation de l'androstènedione en E1 et de la testostérone en E2. Elle est fortement exprimée dans l'allanto-chorion de la jument gestante et atteint son maximum à 6 mois de gestation, pic correspondant à celui des œstrogènes (E2 et E1) circulant chez la jument gestante (Loux et al., 2020).

Ensuite, le HSD17B2 catalyse la réaction entre l'E2 et l'E1 et est exprimé en grande quantité par l'endomètre (pic à 6 mois puis déclin progressif) et le HSB17B1, quant à lui, est exprimé par l'allanto-chorion et catalyse la réaction dans le sens inverse. Ce dernier transcrit atteint plusieurs pics d'expression croissante à 4, 6 et 10 mois (figure 7 et 8). Suite à cela, une quantité plus importante d'E1 comparativement à l'E2 est produite dans la circulation maternelle (Loux et al., 2020), comme cela a été observé dans nos données. Cette expression différentielle de gènes ainsi que les capacités de sulfatation limitées pourraient expliquer la différence significative de concentrations œstrogéniques observée entre races. Des études sur l'expression hétérogène des différents transcrits restent une nouvelle perspective intéressante afin de confirmer l'effet race observé dans l'étude.

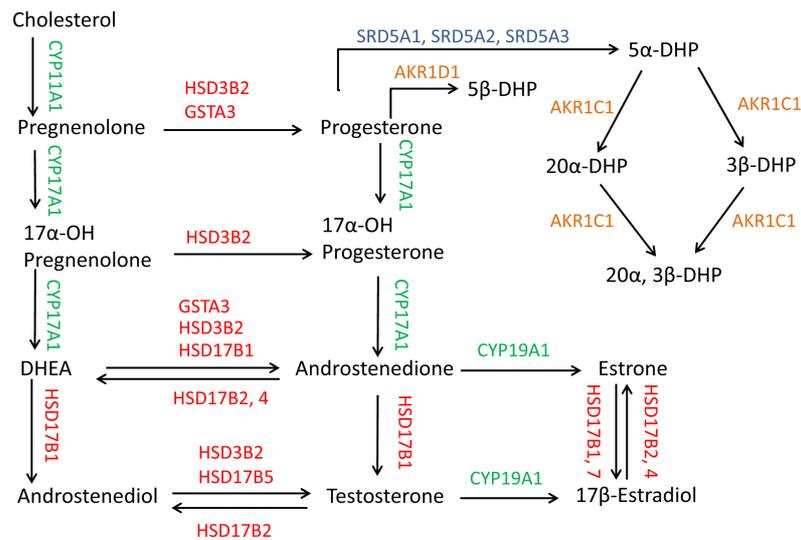


Figure 7 : Présentation de la stéroïdogénèse (Loux et al., 2020).

CYP, cytochrome P450 ; HSD, hydroxystéroïde déshydrogénase ; GSTA3, glutathion transférase A3-3 ; SRD5A, 5α-réductase ; AKR, aldo keto reductase.

Diagramme de zone démontrant l'expression relative de HSD17β1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 et 14 dans (A) le chorioallantoïde et (B) dans l'endomètre pendant la gestation

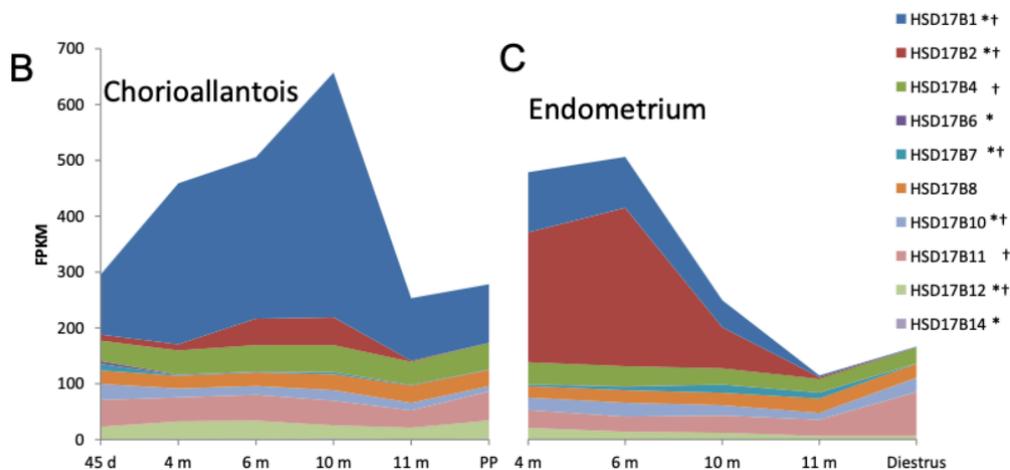


Figure 8 : Diagramme de zone démontrant l'expression relative de HSD17β1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 et 14 dans (A) le chorioallantoïde et (B) dans l'endomètre pendant la gestation (Loux et al., 2020).

HSD17β, 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase. Les différences significatives (P < 0,05) au cours de la gestation sont indiquées par \* (chorioallantoïde) et † (endomètre) dans la légende du graphique.

L'expression de différents transcrits par l'allanto-chorion et l'endomètre est aussi intéressante afin de comparer la concentration en E1 chez des juments gestantes et des juments cyclées.

Selon Noden et collaborateurs (1975), la concentration en E1 dosée par des méthodes immunologiques reste comprise entre 9 et 12 pg/mL durant tout le cycle de la jument. Ces valeurs sont nettement inférieures à celles observées durant la gestation dans l'étude.

Quant à la concentration en E2 chez la jument cyclée, celle-ci se situe entre < à 4 pg/mL 8 heures après le traitement avec les PGF2 $\alpha$  et  $7,2 \pm 2,0$  pg/ml à 96 heures (Noden *et al.*, 1978). Ce range de concentrations est semblable à celui observé chez les juments gestantes dans cette étude. La concentration maximale en E2 chez la jument gestante est atteinte vers 5 mois avec la LC-MS (7,625 pg/mL). Ce pic est atteint 1 mois après le changement lutéo-placentaire (Legacki *et al.*, 2016) et est associé à la sécrétion de PMSG qui stimule les corps jaunes ainsi que le placenta et les gonades fœtales à produire des œstrogènes (Conley, 2016). De plus, la concentration minimale est de 2 pg/mL (9 mois), soit une valeur très proche de la LLOQ. Cela veut dire que l'E2 est bien détectée mais seule une estimation de la concentration peut être réalisable. L'incertitude de la valeur quantifiée et le manque de précision sont donc importants à 9 mois.

De plus, juste avant la parturition, un second pic est atteint à 11 mois (2,775 pg/mL). Selon Conley et Ball (2019), cette augmentation en E2 n'est pas observée en *pré-partum*. Cependant, Canisso et collaborateurs (2017) ont également observé une augmentation *pré-partum* (soit 6 jours avant le poulinage) de la concentration en E2 mesurée par ELISA chez les juments gestantes. Cette divergence d'observation peut donc être liée au moment d'échantillonnage des juments gestantes.

Lors de la prise d'échantillon sanguin, une échographie transrectale mesurant l'épaisseur de l'unité fœto-maternelle a également été réalisée dans le but de diagnostiquer une placentite débutante même si, selon Renaudin et collaborateurs (1997), une épaisseur importante d'unité fœto-maternelle ne correspond pas forcément aux placentas les plus épais *post-partum*. Cette mesure pourrait également permettre d'expliquer une production placentaire différente en œstrogènes. Cependant, contrairement aux dosages hormonaux où une différence significative entre races pour l'E1 et l'E2 a été relevée, les mesures de l'unité fœto-maternelle chez les juments saines suivent une évolution croissante et progressive tout au long de la gestation sans différence significative entre races.

Durant l'étude, 3 juments ont présenté des signes échographiques évidents de placentite et les dosages réalisés chez ces juments étaient parfois supérieurs, parfois inférieurs aux valeurs observées chez les juments saines. De plus, aucune comparaison ne pouvait être réalisée pour l'E2 car les concentrations pour les 2 groupes de juments sont en dessous des LLOQ et ne sont donc que des valeurs estimées. Selon les dosages immunologiques de Canisso, Esteller-Vico et collaborateurs (2017), une diminution de la concentration *pré-partum* (figure 9) en E2 et en E1S devrait être observée. N'ayant qu'un petit échantillon (3) de juments ayant présenté une placentite sur l'année d'étude, les résultats obtenus ne sont pas significatifs et aucune conclusion ne peut être tirée à ce moment. Afin d'y remédier et d'améliorer la précision des dosages œstrogéniques chez des juments pathologiques, il est nécessaire d'augmenter la taille d'échantillon de juments souffrant de placentite. De plus, l'élaboration d'un modèle de culture de cellules trophoblastiques produisant des œstrogènes serait idéal pour déterminer précisément les changements de production hormonale des juments souffrant d'une affection placentaire.

Concentrations en œstrogènes chez les juments présentant une placentite ascendante induite expérimentalement et les juments témoins du même âge gestationnel

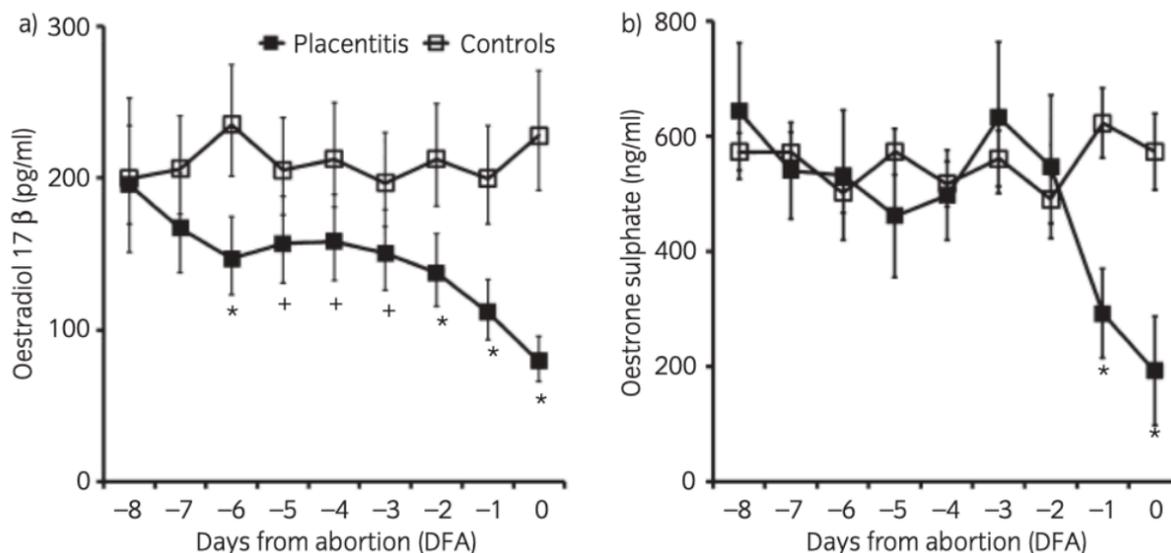


Figure 9 : Concentrations en œstrogènes chez les juments présentant une placentite ascendante induite expérimentalement et les juments témoins du même âge gestationnel. \* indique une différence statistique significative ( $P < 0,05$ ). + dénote une tendance statistique ( $P < 0,1$ ).

## 5. Conclusion

La LC-MS montre un énorme potentiel dans la compréhension de l'hormonologie (E1, E2 et E1S) chez la jument gestante et ce avec la plus grande exactitude, précision et spécificité. Grâce à cette technique, de nouvelles courbes de concentrations œstrogéniques durant la gestation physiologique de la jument ont pu être tracées. Cette étude a également permis d'observer un effet de la race pour les concentrations en E1 et E2 non sulfoconjugués qui n'avait jamais été relevé jusqu'à présent. Des pistes préliminaires telles que l'expression différentielle de transcrits en fonction de la race pourraient exister, cependant, des recherches plus poussées sont nécessaires afin de confirmer cet effet.

Finalement, de nombreuses perspectives s'ouvrent à la suite de ce travail. En effet, un screening complet des œstrogènes par la LC-MS en prêtant une attention particulière à l'effet de la race, du sexe du poulain et de la parité constituerait une avancée dans la compréhension des rôles des œstrogènes. L'élaboration d'un modèle de culture de cellules trophoblastiques permettrait aussi de détecter leurs changements de production hormonale en cas de stress ou d'inflammation.

## 6. Références bibliographiques

- Albrecht, E.D., Robb, V.A., Pepe, G.J., 2004. Regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(11), 5803–5809.
- Bailey, C.S., Heitzman, J.M., Buchanan, C.N., Bare, C.A., Sper, R.B., Borst, L.B., Macpherson, M., Archibald, K. and Whitacre, M., 2012. Diagnosis of equine placentitis using B-mode and Doppler ultra-sonography. *Equine Vet. J.* 44, 88-94.
- Barnes, M., Fite, C., Tibary, A., 2005. Trans-rectal ultrasonographic evaluation of the placenta in Arabian and pony mares in mid-to-late gestation. *Theriogenology.* 64, 787.
- Bergfelt, D.R., Adams, G.P., 2011. Pregnancy. In: McKinnon, A.D. (Ed.), *Equine reproduction*. 2nd edition. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 2065-2079.
- Bucca, S., Fogarty, U., Collins, A., Small, V., 2005. Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Theriogenology.* 64(3), 542–557.
- Bucca S., 2006. Diagnosis of the compromised equine pregnancy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 22(3), 749–761.
- Campos, I.S., de Souza, G.N., Pinna, A.E., Ferreira, A., 2017. Transrectal ultrasonography for measuring of combined utero-placental thickness in pregnant Mangalarga Marchador mares. *Theriogenology.* 96, 142–144.
- Canisso, I.F., Ball, B.A., Esteller-Vico, A., Williams, N.M., Squires, E.L., Troedsson, M.H., 2017. Changes in maternal androgens and oestrogens in mares with experimentally-induced ascending placentitis. *Equine Vet. J.* 49, 244-249.
- Chavatte-Palmer, P., Duchamp, G., Palmer, E., Ousey, J.C., Rosedale, P.D., Lombès, M., 2000. Progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in the uterus and mammary glands of mares from mid-to late gestation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 661–672.
- Colón, J., 2008. Trans-Rectal Ultrasonographic Appearance of Abnormal Combined Utero-Placental Thickness in Late-Term Gestation and its Incidence During Routine Survey in a Population of Thoroughbred Mares. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* 54, 279-285.
- Conley A.J., 2016. Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. *Theriogenology.* 86(1), 355–365.
- Conley, A.J., Ball, B.A., 2019. Steroids in the establishment and maintenance of pregnancy and at parturition in the mare. *Reproduction.* 158(6), 197–208.
- Coutinho da Silva, M.A., Canisso, I.F., MacPherson, M.L., Johnson, A.E., Divers, T.J., 2013. Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Vet. J.* 45(5), 619–624.

Cox, J.E., 1975. Oestrone and equilin in the plasma of the pregnant mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23, 463-468.

Dufour, P., Courtois, J., Seynaeve, Y., Peeters, S., Le Goff, C., Cavalier, E., Ponthier, J., 2021. Development and validation of a liquid chromatography coupled to mass spectrometer (LC-MS) method for the simultaneous quantification of estrone-3-sulfate, progesterone, estrone and estradiol in serum of mares and American bison. *Research in veterinary science* 136, 343–350.

Esteller-Vico, A., Ball, B.A., Troedsson, M., Squires, E.L., 2017. Endocrine changes, fetal growth, and uterine artery hemodynamics after chronic estrogen suppression during the last trimester of equine pregnancy. *Biol. Reprod.* 96(2), 414–423.

Fowden, A.L., Forhead, A.J., Ousey, J.C., 2008. The Endocrinology of equine parturition. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 116(7), 393–403.

Kasman, L.H., Hughes, J.P., Stabenfeldt, G.H., Starr, M.D., Lasley, B.L., 1988. Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. *Am. J. Vet. Res.* 49(2), 184–187.

Kimura, Y., Haneda, S., Aoki, T., Furuoka, H., Miki, W., Fukumoto, N., Matsui, M., Nambo, Y., 2018. Combined thickness of the uterus and placenta and ultrasonographic examinations of uteroplacental tissues in normal pregnancy, placentitis, and abnormal parturitions in heavy draft horses. *J. Equine Sci.* 29(1), 1–8.

LeBlanc M.M., 2010. Ascending placentitis in the mare: an update. *Reprod. Domest. Anim.* 45(2), 28–34.

Legacki, E.L., Corbin, C.J., Ball, B.A., Wynn, M., Loux, S., Stanley, S.D., Conley, A.J., 2016. Progesterone withdrawal at parturition in the mare. *Reproduction.* 152(4), 323–331.

Legacki, E.L., Scholtz, E.L., Ball, B.A., Stanley, S.D., Berger, T., Conley, A.J., 2016. The dynamic steroid landscape of equine pregnancy mapped by mass spectrometry. *Reproduction.* 151(4), 421–430.

Legacki, E.L., Scholtz, E.L., Ball, B.A., Esteller-Vico, A., Stanley, S.D., Conley, A.J., 2019. Concentrations of sulphated estrone, estradiol and dehydroepiandrosterone measured by mass spectrometry in pregnant mares. *Equine. Vet. J.* 51(6), 802–808.

Loux, S.C., Conley, A.J., Scoggin, K.E., El-Sheikh Ali, H., Dini, P., & Ball, B.A., 2020. New insights in equine steroidogenesis: an in-depth look at steroid signaling in the placenta. *Reproduction.* 160(1), 65–82.

Morris, S., Kelleman, A.A., Stawicki, R.J., Hansen, P.J., Sheerin, P.C., Sheerin, B.R., Paccamonti, D. L., LeBlanc, M.M., 2007. Transrectal ultrasonography and plasma progesterone profiles identifies fetoplacental compromise in mares with experimentally induced placentitis. *Theriogenology.* 67(4), 681–691.

Murase, H., Niwa, H., Katayama, Y., Sato, F., Hada, T., Nambo, Y., 2015. A clinical case of equine fungal placentitis with reference to hormone profiles and ultrasonography. *J. Equine Sci.* 26(4), 129–133.

- Niklaus, A.L., Aberdeen, G.W., Babischkin, J.S., Pepe, G.J., Albrecht, E.D., 2003. Effect of estrogen on vascular endothelial growth/permeability factor expression by glandular epithelial and stromal cells in the baboon endometrium. *Biol. Reprod.* 68(6), 1997–2004.
- Noakes, D., Parkinson, T., England, G.(Eds), 2019. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 10th edition. Elsevier, Amsterdam, 848 pp.
- Noden, P.A., Oxender, W.D., Hafs, H.D., 1975. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23, 189–192.
- Noden, P.A., Oxender, W.D., Hafs, H.D., 1978. Early Changes in Serum Progesterone, Estradiol and LH during Prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced Luteolysis in Mares. *J. Anim. Sci.* 47, 3, 666–671.
- Ousey J.C., 2004. Peripartal endocrinology in the mare and foetus. *Reprod. Domest. Anim.* 39(4), 222–231.
- Pashen, R.L., Allen, W.R., 1979. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27, 499–509.
- Pashen, R.L., Allen, W.R., 1979. Endocrine changes after fetal gonadectomy and during normal and induced parturition in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 2, 271–288.
- Peugnet, P., 2014. *Origines développementales des anomalies de l'homéostasie glucidique, de la croissance osseuse et prédisposition à l'ostéochondrose chez le poulain*. (Thèse de doctorat) Université Paris Sud: Paris ; Université de Liège: Liège, 306 pp.
- Raeside J.I., 2017. *A Brief Account of the Discovery of the Fetal/Placental Unit for Estrogen Production in Equine and Human Pregnancies: Relation to Human Medicine*. *Yale J. Biol. Med.* 90(3), 449–461.
- Renaudin, C.D., Troedsson, M.H., Gillis, C.L., King, V.L., Bodena, A., 1997. Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. *Theriogenology.* 47(2), 559–573.
- Robb, V.A., Pepe, G.J., Albrecht, E.D., 2004. Acute temporal regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression in baboons by estrogen. *Biol. Reprod.* 71(5), 1694–1698.
- Robb, V.A., Pepe, G.J., Albrecht, E.D., 2007. Placental villous vascular endothelial growth factor expression and vascularization after estrogen suppression during the last two-thirds of baboon pregnancy. *Endocrine.* 31(3), 260–267.
- Santschi, E.M., LeBlanc, M.M., Weston, P.G., 1991. Progestagen, oestrone sulphate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical and surgical disease. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 627–634.
- Satué, K., Domingo, R., Redondo, J.I., 2011. Relationship between progesterone, oestrone sulphate and cortisol and the components of renin angiotensin aldosterone system in Spanish purebred broodmares during pregnancy. *Theriogenology.* 76(8), 1404–1415.

Senger, P.L. (Ed.), 2015. Pathways to pregnancy and parturition. 3rd edition. Current Conceptions, Redmond, 381pp.

Shikichi, M., Iwata, K., Ito, K., Miyakoshi, D., Murase, H., Sato, F., Korosue, K., Nagata, S., Nambo, Y., 2017. Abnormal pregnancies associated with deviation in progestin and estrogen profiles in late pregnant mares: A diagnostic aid. *Theriogenology*. 98, 75–81.

Souza, A.M., Winter, G.H.Z., Garbade, P., Wolf, C.A., Jobim, M.I.M., Gregory, R.M., Mattos, R.C., 2010. Ultrasonography evaluation of the Criollo mare placenta. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 320-321.

Terqui, M., Palmer, E., 1979. Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27, 441–446.