
CHAPITRE 7 : RÉSUMÉ - SUMMARY

RÉSUMÉ

Les protéines associées à la gestation (PAGs) constituent une grande famille de protéinases aspartiques exprimées dans les cellules épithéliales de la couche superficielle du placenta des artiodactyles et plus précisément dans les granules des cellules binucléées. Des investigations par biologie moléculaire (clonage et séquençage) ont permis de montrer que les protéines de la gestation font partie de la grande famille des protéases aspartiques tout comme le pepsinogène, la pepsine, la chymosine, les cathepsines D et E, et la rénine. La détermination des concentrations en PAG par radioimmunoassay dans le sérum ou dans le plasma est actuellement employée comme méthode sérologique spécifique pour le diagnostic de gestation chez le bovin dès le 28^e jour après la conception. Au-delà de ce délai, les dosages des PAGs peuvent également être utilisés pour assurer le suivi de la gestation notamment dans le cadre de l'étude de la mortalité embryonnaire précoce ou tardive et de la mortalité fœtale.

Au moment d'entreprendre nos investigations expérimentales, une attention particulière a été portée à notre maîtrise des systèmes de dosages radioimmunologiques notamment dans les zones des faibles concentrations de PAG caractérisant le premier trimestre de la gestation chez les bovins. C'est ainsi que les deux premières études sur lesquelles repose ce travail de thèse ont visé à tester de nouveaux antisérums dirigés contre la PAG et à comparer leurs performances en milieu sérique ou plasmatique. Ensuite, cinq différents systèmes de dosages (utilisant différents antisérums) ont été comparés quant à leur sensibilité, spécificité, exactitude des diagnostics positifs et exactitude des diagnostics négatifs, sur des séries de plasmas provenant de femelles non gestantes et de femelles gestantes durant le premier trimestre de la gestation. Dans une troisième étude, les concentrations de PAG, LH et prolactine ont été interprétées en fonction d'une classification basée sur le niveau de progestérone mesuré chez les femelles à jour 21.

Dans la première étude, l'objectif a été de déterminer les paramètres de limite minimale de détection, reproductibilité, exactitude, spécificité et parallélisme des dilutions caractérisant les cinq systèmes radioimmunologiques différents : RIA-497, RIA-706, RIA-780, RIA-809 et RIA-Pool. Ensuite, leur capacité à distinguer les femelles non gestantes et gestantes prélevées au 30^e jour suivant l'insémination artificielle a été analysée dans le détail. L'étude a été menée sur un effectif de 40 femelles de race Holstein-Frisonne d'âge et de parité mélangés dont la

gestation a été confirmée par exploration rectale réalisée entre le 2^e et le 3^e mois après l'insémination. Un groupe contrôle composé de dix vaches maintenues en stabulation entravée confirmées non gestantes par examen échographique et exploration rectale a été utilisé simultanément. Les caractéristiques générales des différents systèmes étaient satisfaisantes. Leur spécificité était excellente à l'exception du système RIA-809 ayant montré une très légère interférence de l'acide sialique et de l'hCG. Les concentrations mesurées dans le plasma des femelles non gestantes sont restées inférieures à 0,5 ng/mL excepté celles qui étaient mesurées dans les systèmes RIA-780 et RIA-809. Seuls les systèmes RIA-497, RIA-706 et RIA-Pool ont fourni des valeurs de sensibilité, spécificité, exactitude des diagnostics positifs, exactitude des diagnostics négatifs égales à 100%.

Dans la deuxième étude, les cinq systèmes de dosage ont été utilisés pour déterminer les concentrations de PAG dans le plasma aux jours 30, 45, 60 et 80. Les corrélations ont été calculées entre les systèmes ainsi que les rapports de concentrations mesurées par chacun d'eux : les systèmes RIA-706, RIA-780, RIA-809 et RIA-Pool ont révélé des valeurs plus élevées que le RIA-497 à tous les stades étudiés.

La troisième étude a visé à vérifier une hypothèse formulée à plusieurs reprises par différents auteurs : le niveau de concentration en progestérone atteint en début de gestation est-il susceptible d'interagir avec les concentrations de protéines trophoblastiques, de LH et de prolactine mesurées plus tard durant le premier trimestre de la gestation ? Dans cette étude, nous avons déterminé les concentrations de l'ensemble des paramètres sur les prélèvements correspondant aux jours 0, 21, 30, 45, 60 et 80 de 37 femelles gestantes. Les femelles ont été réparties en deux sous groupes : celles dont la progestérone au jour 21 était inférieure à la moyenne (*Low-P4*) et celles dont la même progestérone était supérieure à la moyenne au jour 21 (*High-P4*). Lorsque les deux sous groupes ont été suivis aux périodes ultérieures (jours 30, 45, 60 et 80), il est apparu que les concentrations de PAG ont eu tendance à être plus élevées dans tous les systèmes chez les vaches du groupe *High-P4*. Une différence significative est atteinte en utilisant le RIA-497 au jour 80. Les concentrations en LH et prolactine ont eu tendance à être plus faibles à toutes les périodes chez les vaches faisant partie du groupe *High-P4*. La différence a été significative pour la LH à jour 60 et pour la prolactine à jour 21.

Dans leur ensemble, les résultats de ce travail montrent que le diagnostic de gestation peut être amélioré (sensibilité, spécificité, exactitude des diagnostics positifs, exactitude des diagnostics négatifs) en sélectionnant soigneusement les antisérums et en les mélangeant de façon appropriée. Ces systèmes sont utilisables pour suivre les concentrations de PAG durant le premier trimestre de la gestation, les résultats étant fortement corrélés tout en montrant des profils différents.

Associées au dosage de la progestérone, de la LH et de la prolactine, les investigations sur les PAGs permettent de progresser dans l'étude des régulations qui relie l'hypophyse, les gonades et le trophoblaste durant le premier trimestre de la gestation.

SUMMARY

Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) constitute a large family of aspartic proteinases expressed in the outer epithelial cells layer of the placenta of eutherian species and more precisely in the granules of the binucleate cells. Investigations by molecular biology (cloning and sequencing) showed that the PAGs are part of the great family of the aspartic proteases like pepsinogen, pepsin, chymosin, cathepsins D and E, and renin. The determination of the concentrations in PAG by radioimmunoassay in serum or plasma is currently used as specific serological method for the diagnosis of gestation at day 28 after conception. Beyond this time, PAGs assays can also be used to ensure the follow-up of gestation in particular during the study of early or late embryonic mortality and early foetal mortality.

When we started our experimental investigations, a special attention was paid to our control of radioimmunoassay systems especially in the zones with low concentrations of PAG which characterize the first trimester of bovine gestation. Thus the first two studies on which this work was based, aimed testing new antisera raised against PAG, and comparing their performances in seric or plasmatic medium. Then, five various assays (using different antisera) were compared as for their sensitivity, specificity, exactitude of the positive diagnoses and exactitude of the negative diagnoses, on series of plasmas from nonpregnant and pregnant females during the first trimester of gestation. In a third study, the concentrations of PAG, LH and prolactin were interpreted according to a classification based on the progesterone level measured in females at day 21.

In the first study, the objective was to determine the parameters of minimal limit of detection, reproducibility, exactitude, specificity and parallelism of dilutions characterizing the five different radioimmunoassay systems: RIA-497, RIA-706, RIA-780, RIA-809 and RIA-Pool. Then, their capacity to discriminate non-pregnant and pregnant females investigated at day 30 after artificial insemination was also analyzed in detail. The study was undertaken on 40 Holstein-Friesian females of different age and parity, and whose gestation was confirmed by rectal exploration carried out between the second and the third month after insemination. A control group of ten cows maintained in stabling, confirmed non-pregnant by ultrasonography and rectal exploration, was used simultaneously. The general characteristics of the various systems were satisfactory. Their specificity was excellent except for system RIA-809 which

shown a small interference of syalic acid and hCG. The concentrations measured in the plasma of non-pregnant females remained lower than 0.5 ng/mL except those which were measured in systems RIA-780 and RIA-809. Only the systems RIA-497, RIA-706 and RIA-Pool provided values of sensitivity, specificity, exactitude of the positive diagnoses, exactitude of the negative diagnoses equal to 100%.

In the second study, all five systems were used in order to determine the concentrations of PAG in plasma at days 30, 45, 60 and 80. The correlations were calculated between the systems as well as the ratios of concentrations measured by each one of them: systems RIA-706, RIA-780, RIA-809 and RIA-Pool revealed higher values than the RIA-497 at all the studied stages.

The third study aimed to check a hypothesis formulated by various authors: is the concentration level of progesterone reached at beginning of gestation likely to interact with the concentrations of trophoblastic proteins, LH and prolactin measured later during the first trimester of gestation ? In this study, we determined concentrations of the whole parameters on samples corresponding to days 0, 21, 30, 45, 60 and 80 of 37 pregnant females. The females were divided into two groups: those whose progesterone at day 21 was lower than the average (*Low-P4*) and those whose progesterone was higher than the average at day 21 (*High-P4*). When both groups were investigated at later periods (days 30 and 80), it appeared that the concentrations of PAG tended to be higher in all systems in the cows of the *High-P4* group. A significant difference was raised by using RIA-497 at day 80. The concentrations in LH and prolactin lead to be weaker during all the periods in the cows of the *High-P4* group. The difference was significant for LH at day 60 and for prolactin at day 21.

In conclusion, the results of this work show that the diagnosis of gestation can be improved (sensitivity, specificity, exactitude of the positive diagnoses, exactitude of the negative diagnoses) by selecting the antisera carefully and by mixing them in a suitable way. These systems are usable to follow the concentrations of PAG during the first trimester of gestation, the results are strongly correlated while showing different profiles.

Combined to assays of progesterone, LH and prolactin, the investigations on PAGs make progress in the study of the regulations between pituitary gland, gonads and the trophoblast during the first trimester of gestation.