
CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre travail de recherche a d'abord porté sur la mise au point de nouveaux systèmes de dosage de la PAG dans le plasma de bovin. En effet, les travaux de Pérenyi et collaborateurs (2002a,b) avaient montré que des antisérums (R#706 et R#708) générés contre des PAGs isolées à partir d'extraits de placentas de chèvres étaient capables de mieux révéler la PAG de la vache durant le premier trimestre de la gestation. Cependant, des questions restaient posées sur la validation des systèmes développés par Pérenyi. Entre-temps d'autres antisérums dirigés contre des PAGs préparées à partir d'extraits de placenta ovin étaient devenus disponibles (El Amiri *et al.*, 2003 ; 2004).

C'est ainsi que nous avons testé les antisérums R#780 générés contre ovPAG_{57+59kDa} (séquence NH₂ terminale Ile-Ser-Ser-Ile-Arg-Val-Ser-Xxx-Leu-Thr et Arg-Gly-Ser-Asn-Leu-Thr-Ile-His-Pro-Leu pour la PAG_{57kDa} et la PAG_{59kDa} respectivement) et R#809 généré contre ovPAG_{55kDa} (séquence NH₂ terminale Arg-Val-Ser-Xxx-Leu-Thr-Ile-His-Pro-Leu) ainsi qu'un mélange des antisérums R#497 (homologue), R#706, R#780, et R#809 dans des conditions standardisées de dosage.

Au cours de cette étape de notre recherche, nous avons pu vérifier l'excellente capacité des systèmes RIA-706, RIA-780, RIA-809 et RIA-Pool à détecter les faibles concentrations de PAG caractéristiques du début de la gestation. Tous les systèmes sont adaptés pour détecter les femelles gestantes mais les systèmes RIA-780 et RIA-809 manquaient de spécificité (présence possible de faux positifs). Ce manque de spécificité nous a amené à développer une étude de suivi longitudinal portant sur 10 vaches maintenues en stabulation entravée pendant une période de plusieurs semaines.

Cette investigation nous a permis de détecter des épisodes de concentrations non négligeables chez plusieurs femelles. Ces épisodes étaient clairement révélés par les systèmes RIA-780, RIA-809 et RIA-497. De façon apparemment paradoxale, le RIA-Pool est insensible à ces épisodes. Ce dernier système a pourtant fourni les meilleures performances dans tous les tests que nous avons pu réaliser. Cette meilleure efficacité peut s'expliquer par une plus grande aptitude à reconnaître les PAGs apparaissant dans la circulation maternelle tôt après la fécondation. Cette meilleure reconnaissance résulte-t-elle de la liaison de plusieurs anticorps à

différents épitopes d'une même molécule ou de molécules différentes (exprimées précocement) ? Cette question reste parmi les paramètres à expliquer en développant de nouveaux programmes de recherche portant sur le radiomarquage d'autres formes de PAG susceptibles d'être exprimées très précocement par le trophoblaste du placenta bovin.

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, les PAGs font partie de la famille des protéases aspartiques, elles présentent un pourcentage élevé d'identité avec le pepsinogène, la prochymosine, les cathepsines D et E et la rénine (Xie *et al.*, 1991). De plus, à l'instar des autres protéines et hormones placentaires comme le bPL, les PAGs sont glycosylées. Le processus de glycosylation placentaire induit une charge élevée en acide sialique. Cette caractéristique rapproche les PAGs des deux hormones placentaires gonadotropes de référence à savoir l'hCG et la PMSG. Dans notre démarche expérimentale, nous avons pris ces éléments en considération en vérifiant systématiquement la spécificité des différents systèmes de dosages radioimmunologiques vis-à-vis des autres protéases aspartiques, de différents hydrates de carbone faisant partie des chaînes oligosaccharidiques et enfin de l'hCG et la PMSG.

Hormis le système RIA-809 qui a présenté une faible réaction avec des concentrations très élevées d'acide sialique (1mg/ml) et d'hCG (1000 UI/ml), tous les systèmes se sont révélés parfaitement spécifiques. Par ailleurs, pour répondre à la question d'une interférence éventuelle de l'activité enzymatique des protéases pendant la durée d'incubation du dosage, différentes substances anti-protéases ont été ajoutées au tampon. Leur effet a été testé sur la valeur de la liaison non spécifique (NSB) et de la liaison spécifique (B_0/T) dans les conditions standardisées d'incubation. L'addition d'inhibiteurs de protéases comme la pepstatine A et le PMSF ainsi qu'un chélateur du calcium (EDTA) a été recommandée dans le dosage radioimmunologique de la rénine par Searley et Laragh (1975) et Beckerhoff *et al.* (1975) ainsi que dans le système radioimmunologique du dosage du pepsinogène porcine (Banga-Mboko *et al.*, 2003). L'objectif de ces auteurs était d'éviter l'activation du zymogène en sa forme active, de stabiliser la conformation (tertiaire) des molécules à doser et de minimiser des interférences non spécifiques. Dans notre étude, aucun effet des inhibiteurs de protéases ni du chélateur du calcium n'a pu être mis en évidence.

Notre recherche s'est poursuivie par la comparaison de la capacité des différents systèmes de dosages homologues (RIA-497) et hétérologues (RIA-706, RIA-780, RIA-809, RIA-Pool) à mesurer les concentrations de PAG plasmatiques durant le premier trimestre de la gestation (jours 30, 45, 60 et 80 après insémination).

Nos résultats se sont révélés très intéressants car ils montrent que les différents systèmes sont corrélés positivement entre eux ($r \geq 0,81$, $P \leq 0,001$). Par ailleurs, les concentrations ont augmenté significativement entre le 21^e et le 30^e jours après insémination artificielle dans tous les systèmes. Enfin, entre le jour 30 et le jour 80 de la gestation, des concentrations plus faibles étaient observées lorsque le RIA-497 était utilisé. Ce résultat confirme la meilleure aptitude des systèmes RIA-706, RIA-780, RIA-809 et RIA-Pool à reconnaître les différentes formes de PAG exprimées durant le premier trimestre de la gestation.

Cette caractéristique doit être considérée en même temps que l'absence de détection de pics sécrétoires chez les femelles non gestantes. En conclusion de cette partie, nous pouvons considérer le RIA-Pool comme le meilleur système à utiliser. Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour la recherche de nouveaux marqueurs de la gestation et pour le développement d'anticorps dirigés contre différents épitopes situés sur la même molécule ou sur des molécules voisines susceptibles d'être (co) exprimées durant la période allant du 30^e au 70^e jour de la gestation des bovins.

Des progrès dans cette voie permettront de renforcer la sensibilité et la spécificité du dosage lors de l'application dans un laboratoire de routine. C'est ainsi que l'utilisation simultanée de plusieurs systèmes sur des échantillons bien prélevés a permis de révéler des interactions entre la concentration de PAG et d'autres paramètres susceptibles d'interférer avec l'activité sécrétoire des cellules trophoblastiques (Lopez-Gatius *et al.*, 2007 ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2006).

La réalisation des dosages de PAG par différentes méthodes en association avec le dosage de la progestérone, de la prolactine et de la LH nous a permis de vérifier une hypothèse émise fréquemment par les chercheurs : le niveau de progestérone durant les premiers jours de la gestation est-il susceptible de modifier le climat hormonal de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique et des sécrétions trophoblastiques ? Les résultats de nos investigations sont repris dans la publication numéro 3.

Rappelons que les femelles gestantes (n=37) ont été réparties en deux sous lots sur la base du critère du niveau de progestérone à jour 21, la limite de séparation étant la moyenne de 8,7 ng/ml dans un dosage radioimmunologique de la P4 linéaire entre 0,15 et 17 ng/ml. A notre connaissance, c'est la première fois que dans une même étude, des dosages font apparaître l'influence du niveau de la progestérone plasmatique sur la fonction sécrétoire du trophoblaste (en terme de production de PAG). De plus, il est très intéressant d'observer l'évolution des 2 sous-groupes durant les semaines suivantes.

En ce qui concerne la PAG, le groupe *High-P4* a montré des concentrations en moyenne supérieure à celles du groupe *Low-P4* aux différents points de prélèvement : J30, 45, 60 et 80. La différence étant significative dans le RIA-497 au jour 80.

En ce qui concerne la LH, la moyenne des concentrations est plus faible dans le sous-groupe *High-P4*. Ce résultat pouvait être attendu du fait du Feed back négatif de la P4 sur la fonction gonadotrope et plus exactement sur la lutropine hypophysaire.

En ce qui concerne la prolactine, la moyenne des concentrations du sous-groupe *High-P4* est également inférieure à celle du groupe *Low-P4*. Ceci étant particulièrement marqué au début de la période de suivi (J21, 30 et 45). Ensuite, les concentrations s'égalisent entre les 2 sous-groupes.

En ce qui concerne la progestérone, il est intéressant d'observer l'évolution des profils. Au jour 21, les moyennes des 2 sous-groupes diffèrent significativement ($6,3 \pm 1,8$ ng/ml) *versus* $11,1 \pm 3,8$ ng/ml. Ensuite, les deux sous-groupes se rapprochent (Jours 30 et 45) pour s'écarter à nouveau aux jours 60 et 80. La différence étant significative au jour 60.

Toujours concernant le niveau de progestérone, il est très intéressant de noter la divergence de l'évolution des 2 sous-groupes au jour 60 et au jour 80. Alors que la concentration en LH et dans une moindre mesure celle de la prolactine sont en moyenne plus faibles dans le groupe *High-P4*, la concentration de progestérone reste plus élevée. Ceci suggère l'intervention d'un autre facteur lutéotrope d'origine susceptible d'être placentaire. Ce facteur étant peut-être produit de façon proportionnelle à la PAG.

Un contre argument pourrait être avancé en invoquant la capacité intrinsèque du corps jaune à synthétiser la progestérone. Dans ce cas, les femelles du groupe *High-P4* seraient porteuses de corps jaunes plus actifs, sécrétant des quantités accrues de progestérone. Cette meilleure efficacité du corps jaune serait atténuée aux jours 30 et 45 pour devenir à nouveau marquée aux jours 60 et 80.

Du fait que nous n'avons pas eu accès à l'examen des corps jaunes par échographie, cette 2^e hypothèse reste purement spéculative, nous n'avons pas pu la vérifier. Nous préférons garder la première explication consistant à retenir l'intervention possible d'une (de) substance(s) lutéotrophique(s) produite(s) par le placenta.

À ce propos, rappelons que la bPAG-2, une PAG d'origine très ancienne (Hughes *et al.*, 2000), a été considérée à une époque comme représentant la molécule à activité gonadotrope bovine (CG like) du fait de sa liaison au corps jaune (Beckers *et al.*, 1994 ; Szafranska *et al.*, 2007). Aujourd'hui, il est connu que cette glycoprotéine présentant une similitude fonctionnelle avec une hormone « CG-like » est en réalité un polypeptide de 372 acides aminés présentant 58% d'identité avec la boPAG-1 (Xie *et al.*, 1994). L'expression de l'ARNmessenger de la PAG-2 est détectable dès le 17-19^e jour de gestation (Xie *et al.*, 1994) jusqu'au terme (Green *et al.*, 2000)

Malheureusement, à ce jour, aucune préparation purifiée de PAG-2 n'est disponible de sorte qu'aucun modèle biologique ou immunologique ne peut être développé pour tester l'influence hypothétique de cette molécule sur les quantités de progestérone produite par le tissu lutéal du premier trimestre de gestation.

En conclusion, cette troisième partie de notre étude présente la première description d'une relation entre les concentrations de progestérone et de PAG durant le premier trimestre de la gestation chez les vaches laitières. Il a en effet été observé que les concentrations aux jours 30, 45, 60 et 80 de gestation tendent à être plus élevées chez les femelles du sous-groupe ayant montré des concentrations de progestérone supérieures à la moyenne de 8,7 ng/ml au jour 21 après insémination artificielle. Il est prévisible que cette publication suscite de nouvelles investigations chez le bovin et les autres ruminants.