



UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES ANIMAUX DE PRODUCTION

Contribution à la mise au point de méthodes diagnostiques de la
gestation du bison d'Amérique

Contribution to the development of pregnancy diagnosis methods in
American bison

Vincent FRISEE

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES

ANNEE ACADEMIQUE 2026-2027

Remerciements

Le parcours du doctorant n'est pas toujours un long fleuve tranquille et il est souvent le fruit d'une collaboration d'une multitude de personnes mais surtout de leur soutien tout au long du processus. A toutes ces personnes, je vous remercie sincèrement de tout ce que vous m'avez apporté.

A Jérôme, mon promoteur, celui qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours soutenu bien avant le début de cette thèse. Tu as été courageux et patient avec moi et il faut le dire, il en a fallu parfois du courage pour arriver enfin à ce que ce travail aboutisse. Ce qui est sûr, c'est que toutes les étapes passées pour la thèse ont renforcé une amitié déjà bien ancrée depuis de nombreuses années et ont contribué à alimenter des souvenirs pour les personnes qui ont gravité autour du projet, comme pour nous.

A Calixte, mon co-promoteur, tu as été embarqué dans une aventure un peu folle avec une équipe qui a parfois des idées loufoques, par exemple, aller fouiller des bisons d'Amérique. Tu t'es par contre assez vite immergé dans la réalisation du manuscrit et dans une aide précieuse pour apporter une des très principales qualités, cette faculté que tu as d'apporter de la sérénité. Tu m'as permis de canaliser certaines de mes idées et de faire en sorte que ce travail aboutisse.

A Stefan, toi qui a tout de suite accepté d'être dans mon comité de thèse et qui a, toi aussi, toujours cru en mes capacités comme Jérôme. Je commence à bien maîtriser le concept de : « tous les mots comptent », tu nous l'as suffisamment répété mais pas que pour la thèse. Tu es souvent, par ne pas dire plus, un élément fédérateur qui sait rassembler une équipe pour qu'elle travaille ensemble. Il faut dire que tu as un certain don pour partager ta passion de la gastronomie et des vertus bienveillantes et fédératrices d'un repas, fut-ce t'il même frugal.

Je vous remercie aussi Jérôme et toi pour nos réunions de travail hebdomadaires, souvent programmées le lundi et qui avaient souvent un effet bénéfique sur nos humeurs et sur notre motivation. Elles ont souvent été fructueuses et se finissaient souvent sur beaucoup de travail à préparer pour la semaine d'après. Jérôme aime bien déconstruire les idées pour que je les reconstruise la semaine d'après.

A Etienne, vous qui vous êtes toujours montré partant pour relever des défis dans les analyses et qui avez été plus qu'enthousiaste à l'idée de développer avec l'aide de votre laboratoire une

technique de dosage de stéroïdes sur matrice plus qu'insolite. Cette collaboration a continué avec d'autres projets tout aussi variés et qui continuent encore aujourd'hui.

Patrice, merci pour ton expertise dans les analyses en LC-MS/MS et surtout ton temps pour m'expliquer pas à pas la méthode, les limites et me permettre de comprendre toutes les subtilités du dosage des stéroïdes. Sans ton aide, tout cela n'aurait pas été possible.

Goulven, sans cet appel pour aller fouiller des bisons d'Amérique en Ardennes, rien de tout cela n'aurait été possible. Tu as toujours l'art de trouver de nouvelles idées pour des animaux sauvages. Sans tout cela, ce travail n'aurait jamais vu le jour. Encore merci pour cette belle collaboration en ce qui me concerne mais pas la première ni la dernière pour Stéfan et Jérôme et d'autres.

Olimpia, merci pour les analyses en RIA en pleine tempête COVID mais aussi pour ta disponibilité et tes explications.

Au reste de la Team bison, Flore, Sophie, Philippe, Coralie, merci pour votre bonne humeur tout au long de ces belles journées dans la pampa ardennaise en plein mois de janvier et février, votre aide pour les prélèvements, leur traitements, stockage et autres.

Frédéric, merci pour vos discussions et vos corrections minutieuses de l'orthographe de ce travail. Je ne pourrais pas résumer ce que vous m'avez apporté à juste ces quelques mots. Au-delà de tout ce que vous m'avez appris sur mon métier tout au long de ces années passées à vos côtés, vous avez été d'une aide précieuse à titre personnel depuis 2022. Pour cela je ne saurai jamais assez vous remercier.

Christian, merci pour vos relectures et vos conseils dans ce travail mais pas que. Vous m'avez toujours poussé à me dépasser dans ce que j'entreprenais.

Martine, merci pour ton soutien indéfectible. Depuis le début, tu soutiens ce projet et tu auras toujours été là pour me motiver. Tu montrais un enthousiasme à chaque fois que nous en parlions et c'est précieux.

A toutes mes collègues, Justine, Hélène, Solenne, Céline, Freyia et toutes les autres merci pour votre soutien tout au long de ce parcours parfois un peu compliqué. Un merci particulier à Mathilde qui m'aura surtout aidé à remettre de la couleur dans ma présentation, un regard extérieur est toujours intéressant.

De près ou de loin, une série de personnes ont contribué directement ou indirectement à la réalisation des articles, de l'écriture du manuscrit ou aux présentations orales. Il serait difficile de tous vous citer et j'en oublierais sûrement en voulant tous vous citer.

Et enfin un merci particulier à ceux qui, je pense, aujourd'hui sont aussi capables de parler des bisons que moi. Je veux bien sûr parler de ma famille mais surtout de Virginie, Maxime et Alexandre qui ont tout entendu depuis 2021 de ces animaux et de tous les résultats du travail.

Abréviations

20-Oxo-p	<i>20-Oxo-Pregnane</i>
1TP	<i>First trimester of pregnancy</i> - premier tiers de gestation
2TP	<i>Second trimester of pregnancy</i> - deuxième tiers de gestation
3TP	<i>Third trimester of pregnancy</i> - troisième tiers de gestation
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AmB	<i>American Bison</i> – bison d'Amérique – <i>Bison bison bison</i>
ARSIA	Association Régionale de Santé et d'Identification Animale
B	Taureau
BB	Buffle d'eau - <i>Bubalus Bubalis</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – Albumine sérique bovine
BT	Bovin domestique - <i>Bos taurus</i>
BVD	<i>Bovine viral diarrhea</i> - diarrhée virale bovine
CBG	<i>Cortisol Binding Globulin</i> - Globuline liant le cortisol ou transcortine
CJ	Corps jaune
DG	Diagnostic de gestation
E1	Œstrone
E1S	Sulfate d'œstrone
E2	Œstradiol
EB	<i>European Bison</i> – Bison d'Europe – <i>Bison wisent</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> - Hormone folliculo-stimulante
GC	<i>Gaz Chromatography</i> – Chromatographie gazeuse
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> – Gonadotropine chorionique humaine

HLOQ	<i>Higher limit of quantification</i> – Limite Supérieure de Quantification
IBR	<i>Infectious Bovine Rhinotracheitis</i> - rhinotrachéite infectieuse bovine
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i> - Union internationale pour la conservation de la nature
kDa	Kilo Dalton
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Tandem Mass spectrometry</i> – chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem
LH	<i>Luteinising Hormone</i> - Hormone lutéinisante
LLOQ	<i>Lower limit of quantification</i> – Limite inférieure de quantification
LMD	Limite maximale de détection
LOQ	<i>Limit of quantification</i> – limite de quantification
LR	<i>Likelihood ratio</i> – rapport de vraisemblance
MF	Matières fécales
NP	<i>Non pregnant</i> - Non gestante
OATP	<i>Organic anion transporting polypeptides</i> – polypeptides transporteurs d'anions organiques
OST	<i>Organic soluble transporter</i>
P4	Progestérone
PAG	<i>Pregnancy associated glycoprotein</i> – glycoprotéine associée à la gestation
PdG	pregnanediol 3d glucoronide
PEG	Polyéthylène glycol
PGF2 α	Prostaglandines F2 α
PI	Point isoélectrique
PM	Poids moléculaire
PP	Post-partum
PSP	<i>Pregnancy specific protein</i> – protéine spécifique à la gestation
RB	<i>Relative biais</i> – biais relatif

RIA	<i>Radio-Immuno Assay</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RSD	<i>Relative standard deviation</i> – déviation standard relative
Se	Sensibilité
SHBG	<i>Sex hormone-binding globulin</i> – Globuline liant les hormones sexuelles
Sp	Spécificité
TRPUS	<i>Transrectal palpation and ultrasonography</i> – palpation transrectale et échographie
UGB	Unité Gros Bovin
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
WB	Wood Bison – Bison des forêts – <i>Bison bison athabasca</i>

Tables des matières

Résumé.....	1
Summary	3
Préambule général	7
Introduction.....	11
1. Le Bison d'Amérique	12
1.1 Taxonomie et spécificités anatomiques des bisons.....	13
1.1.1 Origine des bisons actuels	13
1.1.2 Spécificités morphologiques du bison	16
1.2 Reproduction chez le bison d'Amérique.....	18
1.2.1 Reproduction des mâles	19
1.2.2 Reproduction des femelles	19
1.3 L'importance du bison américain dans la culture nord-américaine.....	21
1.4. Les enjeux socio-économiques liés aux bisons américains.....	21
1.5 Le Bison d'Europe.....	23
2. Les marqueurs de gestation	25
2.1 Glycoprotéines associées à la gestation	25
2.1.1 Structure	25
2.1.2 Expression	30
2.1.3 Action	30
2.1.4 Élimination	31
2.1.5 Évolution des concentrations sériques durant la gestation	31
2.2 Les stéroïdes sexuels	32
2.2.1 Progestérone et ses métabolites	33
2.2.1.1 Structure.....	33
2.2.1.2 Production	33
2.2.1.3 Action.....	34
2.2.1.4 Élimination	34
2.2.1.5 Évolution des concentrations sériques.....	35
2.2.2 Œstrone et Sulfate d'œstrone	36
2.2.2.1 Structure.....	36
2.2.2.2 Production	37
2.2.2.3 Action.....	37
2.2.2.4 Élimination	39
2.2.2.5 Évolution des concentrations sériques durant la gestation.....	41
3. Matrices et méthodes de dosage	45
3.1 Terminologie.....	45
3.2 La phase d'extraction.....	47
3.3 Les dosages immunologiques	49
3.3.1 Radio-Immuno Assay (RIA)	49
3.3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)	51
3.3.3 La Chromatographie couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS/MS).....	52
4. Résumé de l'état actuel des connaissances de l'endocrinologie de la reproduction des bisons d'Amérique	55
Objectifs	61

Section expérimentale	63
Matériels et méthodes	65
1. Animaux et prélèvements	65
1.1 Origine des animaux	65
1.2 Calcul du jour de gestation au moment du prélèvement	65
1.3 Critères d'exclusion et d'inclusion dans les groupes	65
1.4 Moment et méthodes de prélèvement	66
1.4.1 Palpation transrectale et échographie (TRPUS)	67
1.4.2 Dosages des hormones dans le sérum et dans les matières fécales	70
1.4.2.1 Dosages de PAGs dans le sérum par RIA	70
1.4.2.2 Dosage de la progestérone, de l'œstrone et du sulfate d'œstrone dans le sérum	71
1.4.2.3 Dosage de la progestérone et du sulfate d'œstrone dans les matières fécales	72
2. Statistiques	73
Etude 1	75
Préambule	77
Abstract	79
1. Introduction	80
2. Materials and Methods	81
2.1. Animals and sampling	81
2.2. PAG assays in serum	81
2.3. Progesterone (P4), Estrone (E1) and Estrone-Sulfate (E1S) assays in serum	82
2.4. Statistics	82
3. Results	83
3.1. Breeding results and seasonality	83
3.2. Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) evolution during Bison pregnancy	84
3.3. Progesterone (P4) evolution during bison pregnancy	84
3.4. Estrone (E1) and Estrone Sulfate (E1S) evolution during bison pregnancy	85
4. Discussion	87
5. Conclusion	90
6. Bibliography	91
Etude 2	95
Préambule	97
Abstract	99
1. Introduction	100
2. Material and Methods	102
2.1. Animals and sampling	102
2.2. Chemicals and reagents	102
2.3. Progesterone (P4), Estrone-sulfate (E1S) assays in serum	103
2.4. Feces sample preparation and LC-MS	103
2.5. LC-MS method validation	104
2.6. Homogeneity of fecal matrix and stability during storage at room temperature	106
2.7. Statistics	106
3. Results	107
4. Discussion	111
5. Conclusion	114
6. Bibliography	115

Etude 3	117
Préambule	119
Abstract	121
1. Introduction	122
2. Material and Methods	124
2.1. Animals and sampling	124
2.2. Trans-rectal palpation and ultrasonography (TRPUS)	124
2.3. Assays in serum and in feces	125
2.4. Statistics	125
3. Results	127
3.1. General results	127
3.2. Trans-rectal palpation and ultrasonography for pregnancy diagnosis in American Bison	127
3.3. Hormonal assays in serum and feces for pregnancy diagnosis in American Bison	128
4. Discussion	132
5. Conclusion	136
6. Bibliography	137
Tableaux des données	141
Discussion – Perspectives	149
1. L'intérêt du diagnostic de gestation chez les animaux sauvages	151
2. Choix des méthodes de dosage	153
3. Évolution des concentrations sériques durant la gestation	155
3.1 Glycoprotéines associées à la gestation	155
3.2 Progestérone	156
3.3 Œstrone et sulfate d'œstrone	157
4. Mise au point du dosage dans les matières fécales	159
4.1 Extraction, stabilité et homogénéité des stéroïdes dans les matières fécales de bison	159
4.2 Concentration en stéroïdes dans les matières fécales de bison	160
5. Comparaison des différentes méthodes de diagnostic de gestation chez le bison d'Amérique	163
6. Taux de mise-bas et saisonnalité	167
7. Limites des trois études	171
8. La conservation de l'espèce et la gestion des parcs naturels	173
Conclusions	175
Bibliographie	177

Liste des figures

Figure 1 :	Arbre phylogénétique des bovins actuels comprenant le genre <i>Bison</i> et le genre <i>Bos</i>	14
Figure 2 :	Habitat originel (vert clair) du bison d'Amérique et habitat actuel (vert foncé) (Haines, 1995)	15
Figure 3 :	Bison américain femelle (à gauche) et mâle (à droite) crédit : J. Ponthier	17
Figure 4 :	Bison européen femelle (à gauche) et mâle (à droite) crédit : J. Ponthier	17
Figure 5 :	Conformation du squelette du bison d'Amérique (à gauche) et du <i>Bos taurus</i> (à droite)	18
Figure 6 :	Anatomie du pubis du bison d'Amérique (à gauche) et du <i>Bos taurus</i> (à droite) (Frisée et al., 2025).....	18
Figure 7 :	Structure de la partie glycosylée des glycoprotéines associées à la gestation (PAGs) chez le <i>Bubalus Bubalis</i> (Lotfan et al., 2019).....	26
Figure 8 :	Voies de synthèse des différents stéroïdes sexuels (Williams, 2024).....	32
Figure 9 :	Transport des œstrogènes conjugués et non conjugués (Geyer et al., 2017)...	39
Figure 10 :	Voies de production, d'élimination et de sulfonation des œstrogènes (Parida et Sharma, 2019).....	40
Figure 11 :	Schéma de fonctionnement de l'organic soluble transporter (OST) et réabsorption des hormones stéroïdiennes par la circulation porte (Mkarem et al., 2025)	41
Figure 12 :	Profils plasmatiques en E1S et E2 chez des vaches Holstein-Frisonnes du 100e jour de gestation jusqu'au premier jour du post-partum, et évolutions concomitantes de la relaxation des ligaments sacro-ischiatiques.....	42
Figure 13 :	Variabilité et biais de méthodes diagnostiques (Merrer, 2022)	47
Figure 14 :	Principe de fonctionnement du Radio-Immuno Assay (RIA) (Jyoti, 2023)	50
Figure 15 :	Chromatogramme de l'œstrone (E1) et de l'œstradiol (E2) et de l'ethinyl œstradiol (EE2) (Habi et al., 2022).....	53
Figure 16 :	Evolution de la concentration en 20-oxo-pregnane chez 9 femelles AmB gestantes depuis le mois de juin jusqu'au mois d'octobre avec identification des phases d'œstrus et de copulation (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006).....	56
Figure 17 :	Diagramme de flux des échantillons (commun aux 3 études)	69

Liste des tableaux

Tableau I :	Homologie de la séquence N-terminale en acides aminés entre les PAGs du bison (AmbPAG 74 kDa et 76 kDa) et les PAGs d'autres ruminants (Kiewisz et al., 2008)	28
Tableau II :	Homologie de la séquence N-terminale en acides aminés entre les PAGs du bison (AmbPAG 72 kDa) et les PAGs d'autres ruminants (Kiewisz <i>et al.</i> , 2008)	29
Tableau III :	Données détaillées relatives aux glycoprotéines associées à la gestation (PAGs) chez le Bos taurus, le Bubalus Bubalis et le Bison Bison Bison.....	31
Tableau IV :	Données détaillées, lorsque disponibles, relatives à la progestérone (P4) chez le Bos taurus, le Bubalus Bubalis et le Bison Bison Bison	36
Tableau V :	Données détaillées, lorsque disponibles, pour l'œstrone (E1) chez le Bos taurus, le Bubalus Bubalis et le Bison Bison Bison	43
Tableau VI :	Données détaillées, lorsque disponibles, pour le sulfate d'œstrone (E1S) chez le Bos taurus, le Bubalus Bubalis et le Bison Bison Bison	43
Tableau VII :	Résumé des avantages et inconvénients majeurs de chaque technique utilisée en médecine vétérinaire pour les dosages hormonaux	54
Tableau VIII :	Résumé des connaissances actuelles sur l'hormonologie du bison d'Amérique	57
Tableau IX :	Résultats des dosages pour les mâles.....	143
Tableau X :	Résultats des dosages pour les femelles gestantes – Partie 1	144
Tableau X :	Résultats des dosages pour les femelles gestantes – Partie 2	145
Tableau XI :	Résultats des dosages pour les femelles non gestantes – Partie 1.....	146
Tableau XI :	Résultats des dosages pour les femelles non gestantes – Partie 2.....	147

Résumé - Abstract

Résumé

Le bison d'Amérique, constitué de deux sous-espèces à savoir *Bison bison bison* et *Bison bison athabasca*, était autrefois proche de l'extinction, mais est aujourd'hui élevé pour la production de viande et réintroduit dans le cadre de programmes de conservation. Le développement de méthodes de diagnostic de gestation fiables, non invasives et adaptées à l'espèce est crucial pour optimiser la gestion de la reproduction dans ces différents contextes. Toutefois, le comportement sauvage des bisons et leur morphologie rendent les méthodes classiques, comme le prélèvement sanguin ou la palpation transrectale couplée ou non avec une échographie, peu pratiques. De plus, les données renseignées dans la littérature sur l'endocrinologie de la gestation des bisons d'Amérique sont peu nombreuses. Les techniques utilisées dans ces études antérieures présentaient aussi des limites pour quantifier certaines hormones, au vu de la proximité biochimique de certains des composés dosés. De nos jours, les techniques de dosage par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse permettent de doser simultanément plusieurs composés biochimiquement très proches avec de meilleures sensibilités et spécificités analytiques.

Ce travail vise à développer une méthode non invasive de diagnostic de gestation chez le bison d'Amérique à partir de l'analyse de ses matières fécales. L'étude valide d'abord le dosage des marqueurs de gestation dans le sérum par RIA et LC-MS/MS, avant de comparer l'efficacité de cette méthode sur les matières fécales aux techniques physiques et sériques habituelles. Un objectif secondaire était de décrire la saisonnalité et la fécondité des élevages belges de bisons américains en les comparant aux populations sauvages et d'élevage nord-américaines.

Des échantillons ont été récoltés dans deux ranchs belges. Un total de 99 animaux a été prélevé qui ont été regroupés en cinq catégories : non gestants (NP ; n=32), premier (n=3), deuxième (n=27) et troisième tiers (n=15) de gestation (1-2-3TP) et 7 mâles. Quinze animaux ont été exclus des études pour avortement (n=5), réformes (n=4) ou pour des animaux qui ont vélé dans l'année au-delà de 296 jours après nos prélèvements (n =6). Un diagnostic de gestation par palpation transrectale associé à une échographie a été réalisé chez les femelles. Des dosages sériques ont été réalisés par Radio-Immuno Assay pour les glycoprotéines associées à la gestation et par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour la progestérone, l'œstrone et le sulfate d'œstrone. Ensuite, une méthode de dosage de la progestérone et du sulfate d'œstrone par LC-MS/MS dans les matières fécales a été mise au point. L'homogénéité et la stabilité des concentrations des hormones ont été étudiées dans les matières fécales. Après la mise au point des dosages de

la progestérone et du sulfate d'œstrone dans les matières fécales, les différents moyens de diagnostic ont été comparés.

Dans le sérum, les glycoprotéines associées à la gestation, la progestérone, l'œstrone et le sulfate d'œstrone étaient significativement plus élevés chez les femelles gestantes. Le dosage sérique de la progestérone ne permet pas de déterminer le stade de gestation alors que le dosage du sulfate d'œstrone sérique permet de déterminer si la femelle bison d'Amérique est en 2TP ou 3TP.

Les palpations transrectales ont permis d'établir un diagnostic de gestation ou de non-gestation dans 70% des cas, les 30% restants ayant été renseignés comme non concluants. Lorsqu'un diagnostic était établi, la sensibilité des méthodes physiques s'est avérée très élevée (100%) et la spécificité était correcte (81,8%). Cette technique ne permet pas de dater avec précision la gestation et sa mise en œuvre nécessite une lourde contention, ce qui reste un défi avec des animaux sauvages. Les manipulations ainsi que les palpations transrectales sont dangereuses aussi bien pour les opérateurs que pour l'animal. La concentration en progestérone dans les matières fécales n'est pas corrélée à sa concentration sérique et ne permet pas de dater la gestation ni de la confirmer. Le dosage du sulfate d'œstrone dans les fèces a montré une sensibilité et une spécificité de 100% pour le diagnostic de gestation dans les 2 et 3 TP. Le faible nombre d'animaux inclus dans le 1TP ne permettait pas de tirer de conclusion pour ce stade de gestation.

Le dosage du sulfate d'œstrone dans les matières fécales offre un diagnostic de gestation chez le bison d'Amérique facile à mettre en œuvre, ne nécessitant pas de compétences particulières pour le prélèvement, répétable et fiable à partir du 2TP. Des études complémentaires doivent encore être menées pour permettre la différenciation entre un animal non gestant et un animal en premier tiers de gestation.

Il serait aussi intéressant de transposer ces résultats à d'autres espèces de ruminants sauvages, notamment au bison d'Europe. La précision et la fiabilité des analyses hormonales sur les matières fécales offrent des perspectives pour la gestion des animaux sauvages en captivité ou dans leur milieu naturel en permettant de différencier les femelles gestantes de celles qui ne le sont pas.

Summary

The American bison, comprising two subspecies, namely *Bison bison bison* and *Bison bison athabasca*, that was nearly extinct, is now raised for meat production and reintroduced as part of conservation programs. The Development of reliable, non-invasive, and species-appropriate pregnancy diagnostic methods is crucial for optimizing reproductive management in these various contexts. However, the bison's wild behavior and morphology make blood sampling or transrectal palpation with or without ultrasound, impractical and dangerous for both the animal and the operator. Furthermore, data on the endocrinology of bison gestation are scarce in the literature. The assay techniques used in previous studies also had limitations in quantification due to the biochemical similarity of some of the compounds analyzed. Today, chromatography-mass spectrometry techniques allow for the simultaneous quantification of multiple, structurally similar compounds with improved analytical sensitivity and specificity.

This study aims to develop a non-invasive method for diagnosing pregnancy in American bison based on fecal analysis. It first validates the measurement of pregnancy marker concentrations in serum using RIA and LC-MS/MS, before standardizing the fecal-based method and comparing its efficacy with standard physical and serum-based techniques. A secondary objective was to characterize the seasonality and reproductive performance of American bison herds in Belgium, comparing them with wild populations and North American herds.

Samples were collected from two Belgian ranches. A total of 92 animals were sampled and grouped into five categories: non-pregnant (NP; n=32), and first (n=3), second (n=27), and third (n=15) trimester of gestation (1-2-3TP) and 7 males. Fifteen animals were excluded from the studies due to abortion (n=5), culling (n=4), or calving more than 296 days after our sampling (n=6). Pregnancy diagnosis was performed on the females using transrectal palpation combined with ultrasonography. Serum assays were conducted using radioimmunoassay (RIA) for pregnancy-associated glycoproteins and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for progesterone, estrone, and estrone sulfate. Subsequently, an LC-MS/MS method was developed to measure progesterone and estrone sulfate in feces. Hormone concentration homogeneity and stability within the fecal samples were investigated. Following the development of the fecal assays for progesterone and estrone sulfate, the various diagnostic methods were compared.

In serum, pregnancy-associated glycoproteins, progesterone, estrone, and estrone sulfate levels were significantly higher in pregnant females. Serum progesterone assays do not allow for the determination of the stage of gestation, whereas serum estrone sulfate assays make it

possible to determine whether an American bison female is in the second or third trimester of pregnancy. Transrectal palpation enabled a pregnancy diagnosis in 70% of cases, with the remaining 30% classified as inconclusive. When a diagnosis was established, the sensitivity of physical methods proved very high (100%) and specificity was satisfactory (81.8%). This technique does not allow for precise dating of the pregnancy, and its application requires extensive physical restraint, which remains a challenge with wild animals. Handling and transrectal palpation pose risks to both the operator and the animal. Fecal progesterone concentration does not correlate with serum concentration and allows neither for dating nor confirming the pregnancy. Fecal estrone sulfate assays demonstrated 100% sensitivity and specificity for pregnancy diagnosis during the second and third trimesters. The small number of animals in the first trimester precluded drawing conclusions for that stage of gestation.

Measuring fecal estrone sulfate provides an easy-to-implement method for diagnosing pregnancy in American bison; it requires no specialized sampling skills and yields repeatable, reliable results from the second trimester onwards. Further studies are needed to distinguish between non-pregnant animals and those in the first trimester of pregnancy.

It would also be worthwhile to apply these findings to other wild ruminant species, particularly the European bison. The precision and reliability of fecal hormone analysis offer promising prospects for managing wild animals—whether in captivity or in the wild—by making it possible to distinguish pregnant females from non-pregnant ones.

Préambule général

Préambule général

Le bison d'Amérique est une espèce emblématique dont le suivi des populations connaît un regain d'intérêt, notamment dans une optique de redéploiement dans leur espace sauvage en Amérique du Nord. On distingue deux sous-espèces à savoir *Bison bison bison* et *Bison bison athabasca*, respectivement le bison des plaines et le bison des forêts. Ce travail s'inscrit dans la problématique de conservation de l'espèce, en visant à améliorer les méthodes de diagnostic de la gestation, ce qui permettrait d'éviter de réformer des femelles gestantes, de suivre la fertilité des troupeaux sauvages ou captifs et de réaliser la sélection d'animaux à réintroduire dans leur habitat d'origine. Cependant, bien que génétiquement proche du *Bos taurus* domestique, le bison d'Amérique présente des particularités physiologiques et comportementales qui compliquent considérablement l'étude de sa reproduction. Le bison américain peut vivre à l'état sauvage (sans interaction avec l'Homme) ou être élevé pour la production de viande, dans un système d'élevage extensif, où les interactions avec l'Homme se limitent au strict minimum. Indépendamment de son mode de vie, il faut souligner que le caractère de l'animal reste sauvage, car il s'agit d'une espèce non domestiquée contrairement à *Bos taurus*. Dans la suite de ce document, il sera précisé s'il s'agit d'animaux d'élevage ou à l'état sauvage. De la même manière, la terminologie sauvage fera référence au caractère de l'animal et non à son mode de vie. En Belgique, la législation sur les bovinés est identique quelle que soit l'espèce envisagée. Cela inclut un suivi sanitaire obligatoire une fois par an, notamment pour le dépistage de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR). Cette immobilisation est une opportunité pour déterminer le statut gestationnel des femelles bison d'Amérique présentes dans les élevages, car les suivis de reproduction ne peuvent être réalisés de manière routinière comme chez *Bos taurus*. Néanmoins, les manipulations et le diagnostic de gestation restent difficiles.

Dès lors, l'objectif était de proposer une méthode robuste pour diagnostiquer la gestation chez un ruminant non domestiqué, sauvage et peu manipulable, sur base de matrices biologiques facilement accessibles. Ce défi nous a conduit à valider, adapter et comparer différentes approches diagnostiques, dont des dosages hormonaux de la progestérone, l'œstrone et le sulfate d'œstrone dans le sérum et les matières fécales.

Le choix du bison d'Amérique en tant que modèle se justifie pour plusieurs raisons. Afin de mettre au point une méthode de diagnostic de gestation, il fallait disposer d'un nombre d'individus suffisant à disposition, de données comme les dates de mises-bas, d'échantillons de sérum et de matières fécales. Les populations de cervidés sauvages n'ont pas été envisagées en raison de la difficulté du rassemblement des populations, mais aussi des

difficultés de rassembler les données de mises-bas. Les bovinés gérés à l'état sauvage comprennent le bison d'Amérique et le bison européen. Ce dernier est un animal endémique de certaines régions d'Europe contrairement au bison d'Amérique. Cependant, en Belgique, on ne retrouve le bison d'Europe qu'en faible nombre dans certains parcs, contrairement aux bisons d'Amérique qui peuvent être élevés dans un but de consommation.

En Belgique, il existe 15 troupeaux de bisons (européens et américains confondus) avec un total de 484 individus (information fournie par l'Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA, 2025), ce qui représente une moyenne de 32 animaux par troupeau. Malheureusement, les données de l'ARSIA ne séparent pas les deux espèces. Il existe en Europe une trentaine d'élevages de bisons d'Amérique comprenant un total de ± 900 individus. L'accès aux bisons européens dans les parcs ou les réserves reste complexe. Aucune donnée n'est disponible sur la taille de ces troupeaux et la gestion de leur reproduction. Pour la mise en place d'un diagnostic de gestation se basant sur trois axes (palpation rectale, prélèvement sanguin et de matières fécales), le travail avec des troupeaux de bisons d'Amérique élevés pour la viande présentait de grands avantages de faisabilité qui ont motivé notre choix d'espèce.

Pour proposer un diagnostic de gestation fiable à partir des matrices sérum ou matières fécales, le recours à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) s'est imposé pour deux raisons. D'une part, les immunodosages classiques tels que le *Radio-Immuno Assay* (RIA) ou les *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ont des sensibilités et spécificités analytiques limitées pour la quantification de petites molécules comme les stéroïdes, alors que la LC-MS/MS est en train de s'imposer comme la méthode de référence pour les dosages hormonaux en médecine vétérinaire. D'autre part, les contraintes liées à l'échantillonnage chez une espèce sauvage poussaient à utiliser une matrice facilement disponible, comme les matières fécales, ceci impliquant le recours à une méthode exploitable sur différentes matrices.

Ces choix méthodologiques ont permis d'obtenir des résultats originaux utiles, tant pour la gestion des troupeaux de bisons d'Amérique, que pour la compréhension de leur physiologie reproductive. Un aspect original de ce travail consistait à comparer nos approches méthodologiques à partir de prélèvements réalisés sur les mêmes animaux, avec les mêmes méthodes de dosage mais sur deux matrices différentes : le sérum et les matières fécales.

Introduction

La conservation d'espèces vise à prévenir leur extinction pour maintenir un équilibre écologique. Actuellement, 48 600 espèces animales et végétales sont menacées d'extinction, ce qui représente 28% de l'ensemble des espèces recensées (IUCN, 2025). Les principales menaces pesant sur la faune peuvent être classées en trois catégories : la surexploitation comme la pêche en haute mer, le braconnage, la chasse non durable et le commerce illégal d'espèces sauvages ; la destruction, la dégradation et la fragmentation de l'habitat naturel des espèces, réduisant leur espace et les ressources disponibles ; la pollution et les changements climatiques qui dégradent l'habitat, altèrent les écosystèmes et rendent les espèces plus vulnérables. L'état de conservation peut être évalué en analysant les tendances démographiques, le succès de la reproduction et les impacts de l'Homme de manière directe ou indirecte. L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN) recense les effectifs des animaux en danger d'extinction et les états où les accords internationaux permettent de protéger ces espèces menacées. La conservation *in-situ* permet leur protection et le maintien de leurs effectifs dans leur environnement, en assurant la gestion de leur habitat. La gestion *ex-situ*, ou plan d'élevage en captivité, consiste à gérer des populations en dehors de leur milieu naturel. Dans certains cas, elle peut également faire appel aux technologies de procréation médicalement assistée et permet d'améliorer la fécondité de ces espèces.

Une des clés pour la conservation d'une espèce sauvage passe par la gestion de sa reproduction et la sélection d'animaux en bonne santé et fertiles. Le diagnostic de gestation constitue donc un outil indispensable, permettant de favoriser le bon déroulement de la gestation en gérant les individus reproducteurs de manière optimale. Il aide à adapter les soins (nourriture, environnement, ressources humaines, ...) aux animaux gestants, à remettre rapidement à la reproduction les femelles non gestantes et est crucial pour le suivi des populations en captivité ou en parc. Des méthodes faciles et fiables de diagnostic de gestation sont nécessaires pour la gestion des animaux sauvages (Swanson, 2023).

Le but de ce travail est de proposer des outils pour le diagnostic de gestation chez les herbivores sauvages, en prenant le bison d'Amérique comme modèle. En effet, la gestion d'herbivores sauvages élevés pour la production de viande ou dans des parcs naturels pour conserver l'espèce présente plusieurs défis : leur manipulation demande du matériel, notamment de contention, et une technique adaptée. De plus, leur reproduction est souvent moins bien documentée que celle des animaux domestiques.

1. Le Bison d'Amérique

Bien qu'ayant frôlé l'extinction dans un passé proche, les bisons d'Amérique (*Bison bison bison* et *Bison bison athabasca*) recolonisent leur environnement naturel et les parcs naturels ou sont élevés pour la production de viande. En 2016, le bison d'Amérique était classé comme espèce « quasi menacée » dans la liste rouge de l'IUCN. Néanmoins, grâce aux efforts fournis pour préserver l'espèce, le nombre d'individus est remonté à 12 000 adultes à l'état sauvage (Rogers et Ranglack, 2022). Même si le statut est passé en 2022 de « quasi menacé » à « critiqueusement épuisé », ce qui fait référence à une perte de la fonction de l'espèce dans son écosystème (l'humain ayant colonisé une grande partie de l'habitat d'origine des bisons d'Amérique), l'effectif à l'état sauvage reste faible et les efforts entrepris pour préserver le bison d'Amérique doivent être maintenus. Cependant, les bisons élevés pour la consommation étant considérés comme des animaux d'élevage, au même titre que les individus *Bos taurus* (BT), ils n'ont pas été comptabilisés dans ce recensement (Rogers et Ranglack, 2022). En prenant en compte les animaux élevés pour leur viande, la population mondiale de bisons d'Amérique est estimée à 31 000 têtes (Rogers et Ranglack, 2022). En comparaison, toujours selon la liste rouge de l'IUCN, le bison d'Europe est toujours « quasi menacé » en 2020, avec seulement 2518 animaux adultes recensés (Kowalczyk et Hernandez-Blanco, 2020). Il a été montré que les élevages de bisons d'Amérique en Europe présentaient une plus forte consanguinité qu'aux Etats-Unis, induisant des malformations, une baisse de la fertilité et des veaux mort-nés (Gross et Wang, 2005 ; Janssens *et al.*, 2022), tandis que les troupeaux sauvages (dits de conservation), à partir de 1000 individus, ne présentent pas de problèmes de consanguinité (Licht, 2017).

De manière générale, les différentes espèces et sous-espèces de bisons, toutes caractérisées par un comportement sauvage, présentent des défis uniques pour la gestion de leur reproduction (McCorkell *et al.*, 2013). Que le bison vive à l'état sauvage ou qu'il soit élevé pour la production de viande, connaître son statut gestationnel reste un enjeu à cause de leur caractère peu domesticable. Bien que l'objectif de ce travail soit de développer des outils adaptés pour le suivi de la reproduction des ruminants dans leur milieu naturel, il existe également un intérêt pour un test de gestation pratique de la part des éleveurs qui sont confrontés au quotidien au caractère sauvage de leurs animaux.

1.1 Taxonomie et spécificités anatomiques des bisons

Les bisons américains sont des mammifères faisant partie de la famille des *Bovidae*. Cette famille de mammifères artiodactyles du sous-ordre des ruminants se caractérise par la présence d'un estomac formé de quatre compartiments, d'une mâchoire supérieure dépourvue d'incisives et se divise en neuf sous-familles, dont celle des *Bovinae* (Ben Dhafer, 2021).

Cette sous-famille comprend d'une part, les yaks (*Bos grunniens*), les buffles d'Afrique (*Syncerus*), les buffles d'Asie (*Bubalus*) et, d'autre part, les genres *Bos* et *Bison* qui forment les bovins au sens strict. Le genre *Bison* comprend *Bison bonasus* (Bison d'Europe), *Bison bison athabasca* (Bison américain des forêts) et *Bison bison bison* (Bison américain des plaines) (Ben Dhafer, 2021). Comme il s'agit de *bovinae*, les termes vaches, taureaux et veaux sont communs à *Bos taurus* (BT), *Bison bison bison* (AmB), *Bison athabasca* (WB), bisons européens (BE), et *Bubalus bubalis* (BB). Afin d'éviter les confusions dans la suite du document, il sera chaque fois fait référence aux abréviations entre parenthèses pour désigner un type de *bovinae*. De même, lorsque l'on fera référence à un bison vivant à l'état sauvage, on parlera d'animaux sans interaction avec l'Homme.

1.1.1 Origine des bisons actuels

L'ancêtre des bisons serait originaire du sous-continent indien (Price, 2006), bien que certains auteurs proposent une origine africaine (Martínez-Navarro *et al.*, 2010). La forme la plus ancienne serait *Leptobos* (figure 1) au Pliocène tardif ou Pléistocène ancien, soit à peu près trois millions d'années avant notre ère, qui serait l'ancêtre commun des aurochs et bisons (Pfeiffer-Deml, 1998). L'auroch est l'ancêtre commun de tous les BT domestiques eurasiatiques et du zébu. Selon les données archéologiques et archéozoologiques, cet herbivore a été domestiqué il y a environ 10 000 ans au Moyen Orient et en Inde.

Sur le continent américain, les restes fossiles indiquent que plusieurs lignées de *Bison priscus* ont évolué différemment en plusieurs morphologies classifiées parfois comme des espèces propres, comme *Bison latifrons* et *Bison antiquus* (Ben Dhafer, 2021). Le *Bison latifrons* se serait éteint à la fin du Pléistocène entre 30 000 et 21 000 avant notre ère. Cette espèce de bison aurait ensuite été remplacée par *Bison antiquus* vers environ 25 000 ans avant notre ère. Ce dernier aurait évolué en une autre espèce, *Bison continentalis*, qui est l'ancêtre du *Bison bison* moderne et qui serait apparu il y a environ 10 000 à 5000 ans (Lott, 2002).

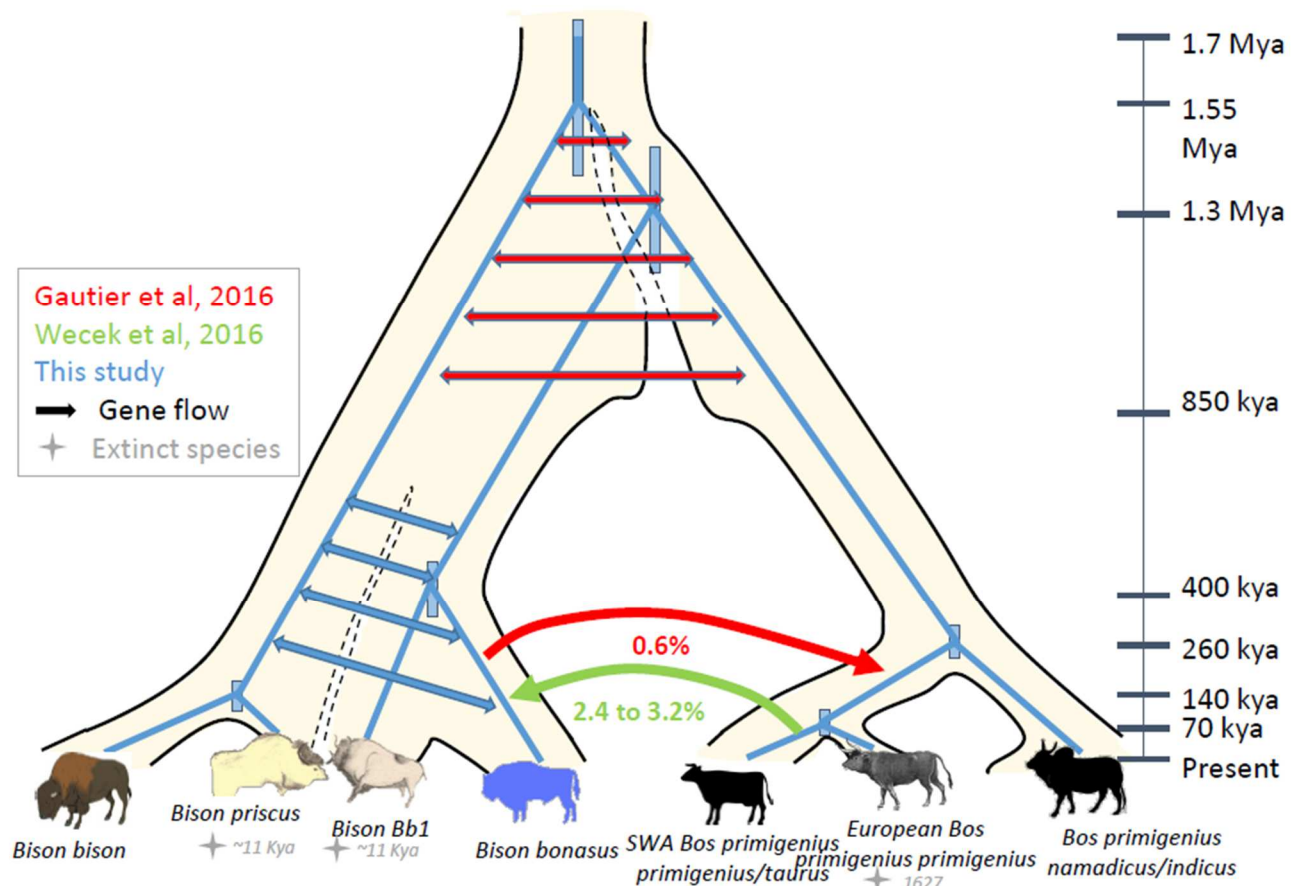


Figure 1 : Représentation schématique de l'arbre évolutif des génomes des Bovinae. Les lignées mitochondriales sont représentées par des lignes bleues, en utilisant les estimations temporelles et les intervalles de plus haute densité a posteriori issus des analyses bayésiennes. Les populations correspondantes ont été représentées en beige telles qu'elles ont été déduites des analyses génomiques. L'ampleur de la séparation entre populations et/ou espèces faisant encore l'objet de flux géniques bidirectionnels est indiquée par des pointillés. Les périodes de divergence prolongées (estimées et proposées) caractérisées par des flux géniques limités sont représentées par des séries de flèches à double sens, tandis que les divers flux géniques directionnels identifiés sont indiqués par des flèches à sens unique, accompagnées de la fraction du génome résultant de ces événements. Le code couleur indique l'étude d'origine des données rassemblées, comme précisé dans l'encadré. Les dates estimées pour les différents événements évolutifs sont indiquées sur une échelle de temps linéaire située sur le côté droit. Les lignées ou espèces éteintes sont signalées par une étoile, accompagnée de la période estimée de leur extinction (Grange et al., 2018).

Les bisons européens et américains sont classés en deux espèces différentes, mais ils possèdent tous deux 30 paires de chromosomes comme le BT, et sont interfertiles, donnant une descendance viable et fertile. Il existe d'ailleurs des troupeaux de bisons américains croisés avec des bisons européens vivant en liberté dans le Caucase russe depuis les années 1950 (Pucek *et al.*, 2002).

Les bisons sont les plus gros animaux terrestres en Europe et en Amérique. Le bison américain peuplait autrefois la grande majorité de l'Amérique du Nord, se répartissant du sud

des Etats-Unis jusqu'au Nord de l'Alaska. La figure 2 représente l'habitat originel en Amérique du Nord du bison d'Amérique ainsi que son habitat actuel. Historiquement, dès le XVIII^{ème} siècle, les colons de Virginie et de Pennsylvanie ont abattu des milliers de bisons AmB et WB parce qu'ils détruisaient leurs clôtures et dévastaient leurs champs. Au XIX^{ème} siècle, leur massacre s'est organisé afin d'occuper des milliers d'hommes désœuvrés après la fin de la guerre de Sécession et de réduire les ressources des Amérindiens. Entre 1870 et 1875, selon un recensement officiel, 12,5 millions de bisons AmB et WB ont été tués pour vendre leurs peaux. En 1889, le nombre d'individus de *Bison bison* avait drastiquement diminué et le cheptel initial estimé à 70 millions de têtes était réduit à 1091 bisons américains vivant dans le monde (Phippen, 2016).

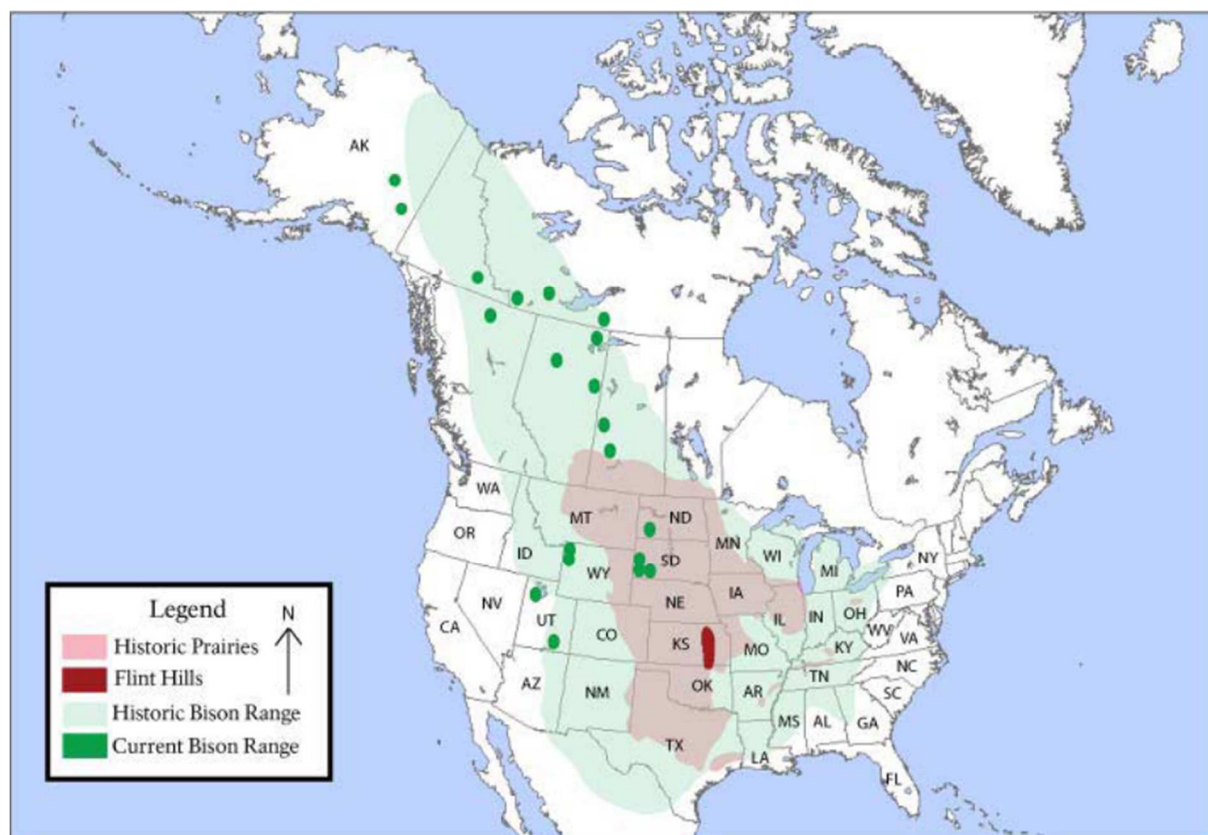


Figure 2 : Habitat originel (vert clair) du bison d'Amérique et habitat actuel (vert foncé). (Haines, 1995).

De nos jours, il y a au moins 25 troupeaux de bisons AmB et WB sauvages en Amérique du Nord, comptant plus de 10 000 têtes dans des parcs nationaux, provinciaux et d'État, incluant des lieux célèbres comme le parc national de Wood Buffalo (Canada), le Custer State Park et le Parc National de Yellowstone. Un petit troupeau de 25 individus rescapés du massacre des bisons AmB et WB opéré durant le XIX^{ème} siècle (Meagher, 1973) vivait dans le parc de Yellowstone. En 1902, les gestionnaires de ce parc ont créé un autre troupeau à partir de 18 femelles provenant du nord du Montana et de trois mâles du Texas (Cahalane, 1944 ; Meagher, 1973). Aujourd'hui, on distingue deux zones d'occupation du parc par les bisons, le

centre du parc avec la moitié du cheptel et le nord avec l'autre moitié. La population de bisons y est estimée à environ 4000 individus.

Dans les parcs d'Amérique du Nord, les bisons AmB et WB vivent à l'état sauvage sans limitation géographique de leur déplacement, ce qui cause des désagréments pour les éleveurs voisins. Par exemple, les éleveurs voisins du parc national de Yellowstone se plaignent de l'extension des troupeaux de bisons, car ils débordent de plus en plus sur leurs terres, provoquant des dégâts sur leurs propriétés et induisant un risque pour la biosécurité de leurs animaux d'élevage. Entre les années 1984 et 2000, plus de 3000 bisons américains sans interactions avec l'Homme ayant migré en dehors du parc de Yellowstone vers le Montana ont été abattus légalement ou braconnés par les populations pour prévenir la transmission de la brucellose aux BT (White *et al.*, 2011).

Ces considérations dans le parc de Yellowstone sont aussi valables pour d'autres parcs et démontrent l'intérêt pour des diagnostics de gestation fiables et non invasifs chez le bison d'Amérique, permettant de sélectionner les animaux sur base de leur statut gestationnel. De plus, les élevages extensifs de bisons AmB ou WB pourraient aussi bénéficier de ces méthodes pour la gestion de leurs troupeaux.

1.1.2 Spécificités morphologiques du bison

L'AmB possède 15 vertèbres thoraciques et quatre lombaires, alors que le BE possède 14 thoraciques et cinq lombaires. La tête de l'AmB est lourde et tombante avec une bosse cervicale plus développée que chez le BE (Knight, 1835). Les AmB adultes sont plus massifs et ont des pattes plus courtes que les BT et les BE, qui sont plus grands et plus minces (Lott, 2002). L'AmB possède un manteau d'hiver aux longs poils brun foncé et un pelage d'été plus léger, d'un brun plus clair. L'AmB peut atteindre 2 m au garrot et de 3 à 3,6 m en longueur (Meagher, 1973). Il pèse généralement entre 450 et 900 kg, même si les plus grands spécimens peuvent dépasser la tonne. Les AmB femelles et mâles (*figure 3*) sont dotés de deux cornes courtes et incurvées, utilisées dans leur lutte pour obtenir un rang supérieur à l'intérieur du troupeau et pour leur défense. Ces cornes incurvées lui donnent un avantage pour l'attaque des prédateurs. De son côté, le BE atteint une hauteur d'épaule moyenne d'environ 180 cm (maximum, 210 cm) pour les mâles et d'environ 170 cm (maximum, 197 cm) pour les femelles (*figure 4*). Ses cornes sont plus longues et se courbent vers le haut, avec une courbure plus prononcée chez les femelles (Krasińska et Krasiński, 2013), ce qui le rend plus habile dans les luttes entre individus.



Figure 3 : Bison américain femelle (à gauche) et mâle (à droite) crédit : J. Ponthier



Figure 4 : Bison européen femelle (à gauche) et mâle (à droite) crédit : J. Ponthier

Une des particularités anatomiques majeures de l'AmB se situe au niveau de la conformation du squelette : la courbure du dos et l'angulation du bassin diffèrent fortement de ce qui est observé chez le BT. La ligne du dos du bison d'Amérique se termine avec une pente descendante assez marquée contrairement au BT où la ligne du dos reste horizontale tout au long de la colonne vertébrale. L'angle formé entre le pubis et les ailes de l'ilium est de 155° chez l'AmB alors qu'il est de 145° chez le BT (Frisée *et al.*, 2025). D'autre part, alors que le sacrum forme un angle aigu avec la pointe postérieure du pubis chez l'AmB, le sacrum est parallèle au pubis chez le BT. La figure 5 illustre ces différences anatomiques générales et la figure 6 illustre la conformation des os du bassin.



Figure 5 : Conformation du squelette du bison d'Amérique (à gauche) et de *Bos taurus* (à droite)

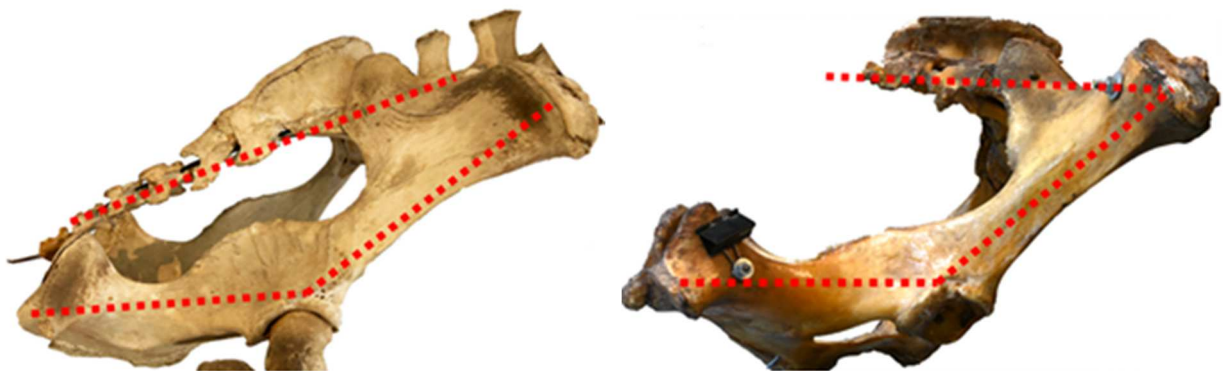


Figure 6 : Anatomie du bassin du bison d'Amérique (à gauche) et de *Bos taurus* (à droite) (Frisée et al., 2025).

1.2 Reproduction chez le bison d'Amérique

L'AmB sans interactions avec l'Homme habite les grandes prairies d'Amérique du Nord en troupeaux importants, de parfois plusieurs centaines de têtes. Les quantités importantes d'herbe dont ils se nourrissent les obligent à se déplacer régulièrement pour de petits trajets quotidiens évitant le surpâturage et pour de longues migrations saisonnières, indispensables à leur survie (Lott, 2002), qui prennent place à la fin de l'été, après la saison de reproduction. Les AmB ont une espérance de vie de 18 à 22 ans, ou de 35 à 40 ans en captivité (Lott, 2002). Les troupeaux sont constitués de femelles, de leurs veaux, ainsi que d'adolescents, et parfois, de quelques mâles. Dans la nature, il existe plusieurs sous-groupes d'une cinquantaine de femelles au sein des troupeaux sauvages de plusieurs centaines d'individus (Meagher, 1973). Les mâles adultes, quant à eux, passent d'un sous-groupe à l'autre. Il existe aussi des sous-groupes composés de jeunes et de vieux mâles qui ne sont pas encore ou plus en âge de se reproduire (Meagher, 1973).

Au vu du caractère sauvage de l'animal, peu d'études décrivent les spécificités de sa reproduction. Néanmoins, quelques données de la littérature, parfois anciennes, permettent d'avoir un aperçu des comportements reproducteurs chez le bison AmB et/ou WB.

Le bison sans interaction avec l'Homme a une reproduction saisonnière, comme la plupart des bovidés sauvages et contrairement aux BT domestiques. Que ce soit dans les études américaines ou européennes, la littérature rapporte que la saison de reproduction s'étend de mi-juillet à début septembre (Acevedo et Barfield, 2023 ; Kirkpatrick *et al.*, 1993 ; Vervaecke et Schwarzenberger, 2006).

1.2.1 Reproduction des mâles

Les mâles sont matures vers l'âge de cinq à six ans, la puberté chez les mâles étant influencée par l'âge et le poids de l'animal (Helbig *et al.*, 2007). A l'état sauvage, les mâles ne dépassent pas les 18 à 22 ans (Meagher, 1973). Dans les troupeaux à l'état sauvage, il y a autant de mâles que de femelles, alors qu'en conditions d'élevage, un ratio d'un mâle pour 12 à 15 femelles est recommandé pour assurer la reproduction (Lammers, 2015). Le mâle peut couvrir jusqu'à 30 femelles durant la première semaine de période de reproduction (Flocchini, 2015 ; Lammers, 2015). Par ailleurs, il existe une hiérarchie chez les mâles : le dominant saillit environ 70% des femelles du groupe en repoussant les dominés, qui sont souvent les plus jeunes mâles et qui ne peuvent donc s'accoupler que par opportunisme. En début de saison de reproduction, les vieux mâles forment des harems et s'accouplent avec les femelles, alors que les plus jeunes mâles ne parviennent à s'accoupler qu'à la fin de la saison, quand il reste des femelles cyclées (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006).

La qualité du sperme semble suivre une évolution saisonnière chez le bison d'Amérique, la concentration et la proportion de spermatozoïdes vivants étant plus élevées pendant la saison de reproduction et les mois qui suivent (Helbig *et al.*, 2007; Krishnakumar *et al.*, 2015). La première insémination artificielle avec du sperme congelé de bison AmB a eu lieu en 1995 (Dorn, 1995).

1.2.2 Reproduction des femelles

Au vu du caractère sauvage de l'animal, il existe moins de données sur la reproduction des femelles que pour le BT.

L'organisation sociale des troupeaux semble être matriarcale : les femelles dominantes reviennent en œstrus plus tôt dans la saison et attirent l'attention des mâles sur une plus longue période que les subordonnées (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006).

La femelle AmB est polyœstrienne saisonnière qui va montrer jusqu'à cinq à six cycles entre juillet et septembre en l'absence de gestation (Cervantes *et al.*, 2016). Certaines femelles pourraient même encore être cyclées jusqu'au début du mois d'octobre (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006), tandis qu'un anœstrus saisonnier est observé pendant les autres périodes de l'année (Cervantes *et al.*, 2016). Le cycle œstral est peu décrit chez l'AmB et le WB, car les données sont difficiles à collecter. Sa durée a été établie sur base du dosage de la progestérone urinaire et serait de 19 à 26 jours, avec une durée moyenne de 23 jours chez l'AmB (Kirkpatrick *et al.*, 1991; Matsuda *et al.*, 1996 ; McCorkell *et al.*, 2013a). Le cycle de l'AmB et du WB semble donc très proche de celui de la vache BT, compris entre 18 et 24 jours (Asdell, 1964). L'œstrus de l'AmB, caractérisé par une queue relevée et une acceptation de chevauchements du mâle, dure entre 36 et 72 heures (Kirkpatrick *et al.*, 1991), avec une moyenne de $40,8 \pm 8$ heures. Dans une étude menée sur 13 individus, cette durée est corrélée au statut hiérarchique des femelles et faiblement à leur poids. Par contre, il n'y avait pas de corrélation entre le statut hiérarchique et le poids ou la date de conception (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006).

La maturité sexuelle des femelles AmB est atteinte, selon l'état corporel, vers 24 à 28 mois, et le premier vêlage est observé vers 36 mois (Blanton *et al.*, 2015). Selon des données rétrospectives, une génisse mettant bas avant ses trois ans n'aura souvent pas de veau l'année suivante et aura une taille adulte inférieure, mais sa fécondité globale sera meilleure jusqu'à l'âge de neuf ans que des femelles mettant bas la première fois après l'âge de trois ans (Green et Rothstein, 1991). Les femelles sont fécondes jusqu'à l'âge de 20 ans, mais l'intervalle entre deux vêlages augmente avec l'âge (Shaw et Carter, 1989).

Dans leur environnement naturel, la saison de mise-bas des AmB a lieu au printemps (de fin avril à début juin) après 257 à 293 jours de gestation (Kirkpatrick *et al.*, 1992; Love *et al.*, 2017 ; Vervaecke et Schwarzenberger, 2006). En élevage, d'après les données de deux grands ranchs de production de bisons AmB établis aux U.S.A., la période de mise-bas s'étend d'avril à mai (Johnston, 2010 ; Minnesota Bison Association, 2025). Le bison d'Amérique donne naissance à un seul veau pesant entre 15 et 30 kg (Blanton *et al.*, 2015) et le sevrage naturel se fait en général 12 mois après la naissance (Flocchini, 2015).

Des récoltes d'embryons chez 8 femelles superovulées ont conduit à des taux de récupération supérieurs à ceux observés chez l'AmB sans superovulation (0,8 embryon de qualité jugée transférable contre 0,2) (Barfield et Seidel, 2012). La saison semble jouer un rôle sur le nombre d'embryons récoltables chez l'AmB (Barfield et Seidel, 2012). Le nombre d'embryons récoltables par femelle en saison de reproduction est de 4,3 contre 2,3 hors saison (Palomino *et al.*, 2017). La qualité des embryons est aussi supérieure en période de reproduction que durant la période anovulatoire (Palomino *et al.*, 2017).

1.3 L'importance du bison américain dans la culture nord-américaine

Le bison d'Amérique occupe une place importante dans la culture américaine, mais surtout dans la culture amérindienne, en plus d'avoir été la source presque exclusive de nourriture des populations autochtones. Par le passé, la viande de bison nourrissait les tribus amérindiennes, tandis que la peau épaisse servait à confectionner des tipis, des vêtements et des boucliers. Les os et les tendons étaient transformés en outils et instruments.

Dans les tribus amérindiennes, le bison américain était vénéré comme un être sacré, figurant au centre de nombreux mythes et rituels. Le bison blanc est notamment le symbole suprême de l'espoir et de la renaissance.

En 1870, le gouvernement fédéral des USA a encouragé le massacre systématique des troupeaux pour priver les nations autochtones de leur principale ressource, facilitant ainsi leur soumission et leur déplacement vers des réserves. Une prise de conscience de l'enjeu de la préservation du bison d'Amérique a mené, au début du XX^{ème} siècle à la création de parcs nationaux pour tenter de sauver cette espèce. En 2000, le plan de conservation du bison a permis d'inscrire un cadre légal sur la chasse et le braconnage de cette espèce ainsi que sur la régulation de sa population. L'AmB est devenu officiellement le mammifère national des Etats-Unis d'Amérique le 9 mai 2016 suite à la signature de la loi « National Bison Legacy Act », partageant son statut d'emblème animalier national avec l'aigle américain (pygargue à tête blanche).

1.4 Les enjeux socio-économiques liés aux bisons américains

Pour éviter les abattages récurrents des AmB sans interaction avec l'Homme ayant migré hors du parc de Yellowstone, le plan fédéral de conservation du bison, mis en place en 2000, inclut la capture de ces AmB sans interaction avec l'Homme. Cette capture permet de tester la brucellose chez les AmB sans interaction avec l'Homme pour abattre les individus porteurs, de gérer le nombre d'animaux dans le parc de Yellowstone et de transférer des bisons AmB et WB sains vers d'autres troupeaux. Les captures de bisons AmB et WB se déroulent idéalement avant que les femelles n'atteignent leur dernier tiers de gestation (Nickoloff, 2021) pour limiter les risques d'avortement suite au stress. Si des femelles gestantes sont porteuses de la brucellose, elles sont maintenues en captivité dans des enclos au sein du parc de Yellowstone jusqu'au vêlage. Le pourcentage d'avortements dans des troupeaux nouvellement infectés atteindrait 30 à 80%. Dans les troupeaux où l'infection est endémique, comme la population d'AmB du parc de Yellowstone, les femelles avortent entre une et trois fois puis donnent naissance à des veaux sains : le passage transplacentaire de la bactérie serait donc très faible une fois l'immunité installée (Tjahajati, 2014). Cependant, *Brucella spp.*

se transmet par le lait et peut donc contaminer les veaux après la naissance (Tjahajati, 2014). Il existe un programme de contrôle de la brucellose dans les élevages depuis plus de 80 ans aux Etats-Unis. Cependant, les animaux sauvages, tels que l'Amb ainsi que le Wapiti constituent un réservoir de *Brucella abortus* et posent un risque de réintroduction de cette maladie dans les troupeaux qui en sont indemnes (Olsen, 2010). Le développement de nouveaux vaccins, de diagnostics et de nouvelles procédures d'isolement sont nécessaires pour un contrôle effectif de *Brucella abortus* (Olsen, 2010). La propagation de *Brucella abortus* dans des troupeaux de production induirait une perte économique importante, car un troupeau infecté doit être entièrement abattu. Dans les zones à risque, notamment aux alentours du parc de Yellowstone, des vaccins contre *Brucella abortus* sont autorisés, mais leur coût est non négligeable pour les producteurs (Olsen, 2010).

1.5 Le Bison d'Europe

Le bison d'Europe (BE) ou *wisent* (*Bison bonasus*) vit dans la forêt, mais des analyses de vestiges du Pléistocène suggèrent que la forêt n'est qu'un refuge, car il aurait été chassé des espaces ouverts par nos ancêtres (Bocherens *et al.*, 2015). Il préfère les habitats mixtes et se caractérise par une alimentation variée, broutant de l'herbe quand c'est possible, mais se nourrissant aussi de pousses et de feuilles (Bocherens *et al.*, 2015; Markova *et al.*, 2015).

Ces animaux évitent les humains et prennent la fuite à leur vue, à moins que ceux-ci ne se rapprochent trop, auquel cas, les BE chargent (Haidt *et al.*, 2018). Ils vivent en petits groupes d'environ 10 à 20 femelles, veaux et jeunes de deux à trois ans. Les mâles adultes quittent le troupeau pour former des petits groupes qui ne défendent pas un territoire.

En termes de reproduction, le BE est très proche de l'AmB. Le cycle du BE serait compris entre 18 et 22 jours (Krasinski et Raczyński, 1967). L'âge au premier vêlage serait de 48 mois (Dallezcyk, 2011). La durée de gestation pour le BE est comprise entre 254 et 272 jours (Krasinski et Raczyński, 1967). Les autres données de reproduction des femelles et des mâles semblent similaires à l'AmB (Acevedo et Barfield, 2023).

Le BE vivait sur tout le continent ouest européen jusqu'au moyen âge, où la chasse intensive l'a progressivement fait disparaître. Certaines populations ont trouvé refuge en Allemagne de l'est et en Transylvanie jusqu'au XVII^e siècle. La destruction de l'habitat naturel au début du XX^e siècle a encore accentué ce phénomène, les derniers individus ont survécu en Pologne jusqu'en 1920. Aujourd'hui le BE vit à l'état sauvage dans des parcs nationaux en Europe centrale, notamment en Pologne, Roumanie, Ukraine, Biélorussie, Slovaquie, Russie, Lituanie, Allemagne et Suisse. On rencontre aussi cette espèce dans des parcs animaliers à travers le monde. En Belgique, il y a actuellement des BE au Domaine des Grottes de Han et au parc animalier Forestia. Un troupeau de BE devrait être réintroduit dans le futur parc naturel de Boesland, qui sera ouvert en 2027 dans le Limbourg belge.

2. Les marqueurs de gestation

Les marqueurs de gestation sont des indicateurs biologiques, souvent hormonaux, qui permettent de confirmer et de suivre l'état de gestation des femelles. Quatre marqueurs ont été étudiés dans cette thèse : les glycoprotéines associées à la gestation (PAGs), la progestérone (P4), l'œstrone (E1) et le sulfate d'œstrone (E1S). Cette section va détailler les caractéristiques de ces quatre marqueurs en insistant sur leur rôle, leur action et leur élimination. Elle présentera également l'état des lieux des connaissances chez le bison d'Amérique (AmB) ainsi qu'une comparaison avec ce qui est décrit chez *Bos taurus* (BT) et *Bubalus bubalis* (BB).

2.1 Glycoprotéines associées à la gestation

Ces protéines ont été observées chez tous les ruminants. Chez le BT, les PAGs ont été décrites au début des années 1980 (Butler *et al.*, 1982). Il s'agit de glycoprotéines spécifiques de la gestation avec un poids moléculaire (PM) compris entre 47 et 70 kDa (Nguyen *et al.*, 2012 ; Telugu *et al.*, 2009).

2.1.1 Structure

Ces glycoprotéines appartiennent à la sous-classe des protéases aspartiques (Sousa *et al.*, 2002 ; Wallace *et al.*, 2015), de la famille des pepsines fonctionnant habituellement en milieu acide. Les PAGs font partie de la même famille de glycoprotéines que l'hormone gonadotrope humaine (hCG), l'hormone gonadotrope équine (eCG), l'hormone lutéotrope (LH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH) ou encore l'hormone thyroïdo-stimulante (TSH). Les PAGs ne possèdent cependant qu'une seule chaîne polypeptidique, et non deux comme les gonadotropines, qui ont une structure tridimensionnelle bilobée. Aucune des molécules précitées de la famille des glycoprotéines n'est active sur le plan enzymatique (Sousa *et al.*, 2006).

Chez les ruminants, la famille des gènes codant pour les PAGs est particulièrement vaste et complexe. Chez les BT, 22 gènes (*boPAG-1* à *boPAG-22*) ont été séquencés (Barbato *et al.*, 2017a; Barbato *et al.*, 2018; Sarkar, 2012 ; Wallace *et al.*, 2015) tandis que l'on en rencontre 11 chez les ovins (11 *ovPAG*) (Barbato *et al.*, 2017a), 12 chez les caprins (12 *caPAG*) (Sarkar, 2012; Serrano-Perez *et al.*, 2016), 10 chez les cervidés (10 *cePAG*) (Garcia-Ispuerto *et al.*, 2013) et 19 chez les BB (*wtPAG-1* (Beckers *et al.*, 1994) ; *wtPAG-2* à *wtPAG-19* (Kiewisz *et al.*, 2009)) et au moins 3 chez l'AmB (Kiewisz *et al.*, 2008). La description de ces glycoprotéines reste partielle, et aucune étude exhaustive comparant l'ensemble des PAGs

entre les différentes espèces de ruminants n'a encore été publiée. Seules des comparaisons partielles, limitées à certaines séquences ou isoformes, ont été réalisées à ce jour. La figure 7 présente la variabilité de la partie glycosylée des PAGs chez le BB. Il existe de nombreuses homologies dans la structure de la partie glycosylée des PAGs entre les différents ruminants. Cependant, on constate des différences dans la séquence d'acides aminés terminaux de ces mêmes PAGs. Seules trois PAGs ont été séquencées pour comparer la séquence N-terminale aux autres PAGs connues de bovinés. Le tableau I illustre les homologies et les différences entre l'AmB PAG 74 kDa et 76 kDa et les PAGs des BT, des ovins et des caprins. Le tableau II illustre ces mêmes homologies et différences mais cette fois-ci pour l'AmB PAG 72 kDa.

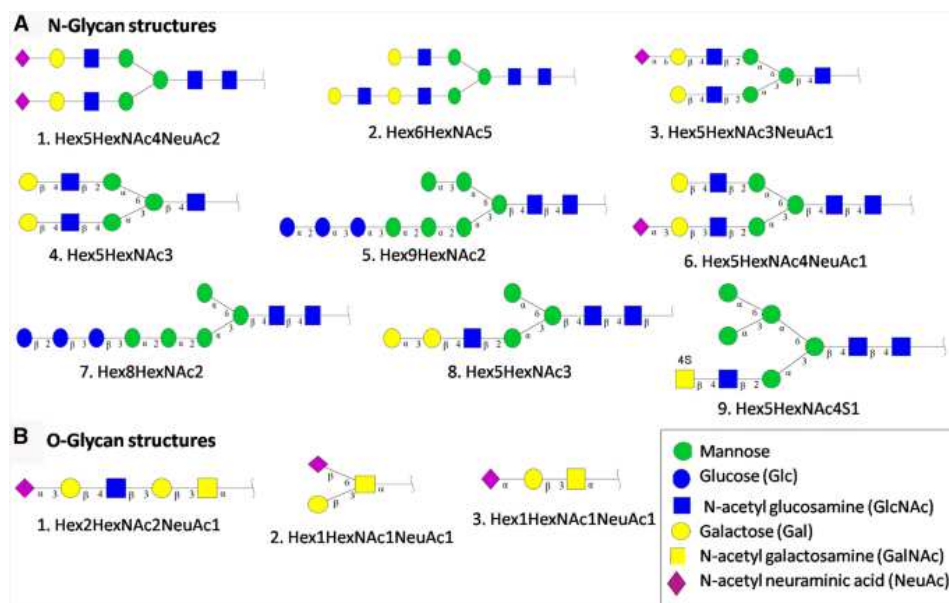


Figure 7 : Structure de la partie glycosylée des glycoprotéines associées à la gestation (PAGs) chez *Bubalus bubalis* (Lotfan et al., 2019)

Tableau I : Homologie de la séquence N-terminale en acides aminés entre les PAGs du bison (AmbPAG 74 kDa et 76 kDa) et les PAGs d'autres ruminants. Les acides aminés grisés sont ceux qui diffèrent de la séquence en acides aminés des AmbPAG 74 et 76 kDa (Kiewisz *et al.*, 2008)

Protein or precursors	Accession number	Consensus	Id (%)															
(A)																		
AmbPAG _{74kDa}	P84917	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	100															
AmbPAG _{76kDa}	P84918	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	100															
boPAG 7 (341 aa)	AF020509	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	96															
boPAG 4 (380 aa)	AF020506	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	92															
boPAG 6 (379 aa)	AF020508	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	92															
ovPAG 4 (380 aa)	U94790	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	92															
caPAG 1 (380 aa)	AF191326	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	88															
boPAG 15 (380 aa)	AF192332	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	88															
boPAG 17 (380 aa)	AF192334	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	84															
caPAG 3 (380 aa)	AF191328	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	80															
boPAG 1 (380 aa)	M73962	R G S S N L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G																
(B)																		
AmbPAG _{74kDa}	P84917	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	100															
AmbPAG _{76kDa}	P84918	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	100															
boPAG _{75kDa}	O46495	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	100															
boPAG _{56kDa}	Q9T1V7	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	100															
ovPAG _{59kDa}	P83444	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	93															
boPAG _{75kDa}	O46494	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	91															
ovPAG _{58kDa}	P83495	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	87															
boPAG _{66kDa}	Q29432	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	87															
ovSBU _{38kDa}	Q9TRE1	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	80															
zebuPAG _{67kDa}	P83126	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	80															
caPAG _{62kDa}	P80933	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	79															
caPAG _{55kDa}	P80935	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	76															
ovSBU _{36kDa}	Q9TRE2	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	76															
ovPAG _{59kDa}	P83499	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	75															
ovPAG _{58kDa}	P83493	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	75															
ovPAG _{60kDa}	P83498	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G																
boPAG _{67kDa}	Q7M 318	R G S S x L T I H P L R N I R D D I F Y V G x I T I G	56															

empty cycles during Edman sequencing caused by N-glycosylation.

x, empty cycles during Edman sequencing caused by N-glycosylation.
 *, not know amino acid.

Tableau II : Homologie de la séquence N-terminale en acides aminés entre les PAGs du bison (AmbPAG 72 kDa) et les PAGs d'autres ruminants. Les acides aminés grisés sont ceux qui diffèrent de la séquence en acides aminés de l'AmbPAG 72 kDa (Kiewisz *et al.*, 2008)

Protein, or Precursors	Accession number	Consensus	Id (%)															
(A)																		
AmbPAG72 kDa	P84916	R	G	S	x	L	T	S	L	H	P	L	Q	N	V	I	D	L
boPAG66(379 aa)	AF020508	R	G	S	N	L	T	T	T	T	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG21(380 aa)	AF192338	R	G	S	N	L	T	T	T	L	P	L	R	N	I	E	D	L
boPAG3v(378 aa)	L06153	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	K	D	L
boPAG4(380 aa)	AF020506	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG7(341 aa)	AF020509	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG16(380 aa)	AF192333	R	G	S	N	L	T	T	T	L	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG1(380 aa)	M73962	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	K	D	L
boPAG14(374 aa)	AF192331	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	M	N	I	W	D	L
boPAG15(380 aa)	AF192332	H	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG17(380 aa)	AF192334	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	M	D	L
boPAG20(380 aa)	AF192337	R	G	S	N	L	T	T	T	L	P	L	R	N	I	W	D	L
caPAG3(380 aa)	AF191328	R	D	S	N	L	T	T	T	V	P	L	R	N	I	W	D	L
caPAG9(383 aa)	AF191334	R	G	S	N	L	T	T	T	L	P	L	R	N	I	M	D	L
ovPAG4(380 aa)	U94790	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
ovPAG8(341 aa)	U94794	R	G	S	N	L	T	T	T	H	P	L	M	N	I	W	D	L
caPAG1(380 aa)	AF191326	P	V	S	N	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
(B)																		
AmbPAG72 kDa	P84916	R	G	S	x	L	T	S	L	H	P	L	Q	N	V	I	D	L
boPAG56 kDa	Q9TV7	R	G	S	x	L	T	T	T	L	P	L	R	N	I	R	D	L
boSBU362 kDa	Q9TRE1	*	G	S	x	L	T	T	T	L	P	L	R	N	I	K	D	L
zeboPAG67 kDa	P83126	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
ovPAG58 kDa	P83495	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
ovSBU369 kDa	Q9TRE2	Q	G	S	x	L	T	T	T	L	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG75 kDa	O46494	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG75 kDa	O46495	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
boPAG66 kDa	Q29432	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	K	D	L
boPAG66 kDa	P83444	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
ovPAG59 kDa	P83493	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	R	D	L
ovPAG58 A kDa	P80933	R	D	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	T	K	D	L
caPAG62 kDa	P83499	R	G	S	x	L	T	T	T	V	P	L	R	N	M	R	D	L
ovPAG59 G kDa	P80935	P	V	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	I	K	D	L
caPAG55 kDa	P83498	R	G	S	x	L	T	T	T	H	P	L	R	N	T	K	D	L
ovPAG60 F kDa	Q7M318	R	G	H	x	L	T	T	T	F	P	L	R	N	F	K	D	L

x, empty cycles during Edman sequencing caused by N-glycosylation.

*, not known amino acid.

() , gap inserted for optimal alignment.

2.1.2 Expression

Leur expression dépend d'un processus actif qui suppose la présence d'un tissu trophoblastique sain et, par conséquent, d'un embryon sain. Chez les ruminants, des cellules mono- et binucléées du trophoctoderme migrent dans le tissu utérin et fusionnent avec les cellules épithéliales utérines maternelles pour former des cellules trinuéées hybrides foeto-maternelles qui vont sécréter les PAGs (Chethan *et al.*, 2014; Pugliesi *et al.*, 2014; Touzard *et al.*, 2013). De nombreux auteurs ont mis en évidence la relation entre la synthèse des PAGs et la viabilité foetale ou la gémellité (Chethan *et al.*, 2014; Pugliesi *et al.*, 2014; Touzard *et al.*, 2013). Les concentrations de la protéine spécifique de la gestation bovine (b-PSPB) sont plus élevées lors des gestations gémellaires, mais les fortes variations individuelles ne permettent pas de prédire avec précision le nombre de foetus (Szelenyi *et al.*, 2018).

Chez les ruminants, les PAGs sont détectées dans la circulation maternelle durant la gestation (Barbato *et al.*, 2009 ; Beriot *et al.*, 2014 ; Xie *et al.*, 1994). Les PAGs ne sont pas toutes produites au même stade de gestation : certaines sont exprimées au début, dès le 25^{ème} jour, tandis que d'autres sont uniquement présentes du milieu à la fin de la gestation (Barbato *et al.*, 2018). Ces différences d'expressions temporelles ouvrent la voie à des spéculations sur leur rôle physiologique. La b-PSPB, une des PAGs des ruminants, rencontrée entre autres chez la chèvre, le mouton, le cerf, le BT et l'AmB (Humblot, 1990 ; Love *et al.*, 2017), est détectable dans la circulation périphérique dès 25 jours de gestation chez la vache (BT) et a une origine trophoblastique (Butler *et al.*, 1982).

2.1.3 Action

Elles pourraient participer au maintien du corps jaune (CJ) et seraient impliquées dans l'adhérence entre le placenta et l'endomètre ainsi que dans l'isolement des antigènes maternels ((Hughes *et al.*, 2025 ; Wooding *et al.*, 2005)). Les PAGs jouent un rôle déterminant dans le paradoxe immunologique de la gestation : elles modifient la transcription endométriale, inhibent le recrutement local des lymphocytes T et réorientent l'équilibre immunitaire maternel, l'éloignant des voies pro-inflammatoires au profit de voies anti-inflammatoires et de tolérance du conceptus. Ce mécanisme prévient le rejet du foetus semi-allogénique (Thornton et Rutigliano, 2026).

2.1.4 Élimination

La demi-vie estimée des PAGs chez le BT est variable d'une PAG à l'autre et est estimée de huit à 10 jours. La diminution de la concentration post-partum des PAGs dans le sang chez le BT semble suivre une droite et on peut considérer que la concentration est minimale 60 jours post-partum (Haugejorden *et al.*, 2006). Un dosage de PAGs élevée ne permet donc pas toujours d'assurer que la femelle est gestante au moment du prélèvement. Chez le BT, l'utilisation du dosage des PAGs est recommandé après 100 jours post-partum (Humblot *et al.*, 1988).

2.1.5 Évolution des concentrations sériques durant la gestation

Chez le BT, la b-PSPB devient détectable (>1 ng/mL) environ 30 jours après la fécondation et sa concentration augmente progressivement tout au long de la gestation, atteignant un maximum juste avant la mise-bas (544 ± 144 ng/mL), puis diminue après le vêlage. En cas de rétention placentaire, les concentrations post-partum en PAGs peuvent rester élevées plus longtemps. Chez le BB, les PAGs sont détectables dès le 23^{ème} jour après la fécondation et leurs concentrations augmentent régulièrement jusqu'à la fin de la gestation. Chez l'AmB, la b-PSPB est détectable dès le 45^{ème} jour post-fécondation et sa concentration augmente progressivement jusqu'à la fin de la gestation, avec des concentrations plus faibles que chez le BT. Les données détaillées relatives aux PAGs sont reprises dans le tableau III.

Tableau III : Données détaillées relatives aux protéines associées à la gestation (PAGs) chez *Bos taurus*, *Bubalus bubalis* et *Bison bison bison* (concentrations moyennes $\pm$ déviation standard)

Espèce	PAGs	Jours de gestation	Concentrations sériques (ng/mL)	Méthode	Références
<i>Bos taurus</i>	b-PSPB	30	>1	RIA	Sasser <i>et al.</i> , 1986
		90	$9,0 \pm 0,6$		
		180	35 ± 6		
		270	150 ± 75		
		282	542 ± 144		
<i>Bubalus bubalis</i>	PAGs	23	0,3	RIA	Barbato <i>et al.</i> , 2017b
		45	11,7		
		270	29,9		
<i>Bison bison bison</i>	PAGs	45	$1,42 \pm 1,29$	ELISA	Love <i>et al.</i> , 2017
		150	$2,6 \pm 0,92$		
		280	$3,84 \pm 0,38$		

2.2 Les stéroïdes sexuels

Les stéroïdes sexuels dérivent du cholestérol et, comme les stéroïdes en général, leur noyau stérane est composé de quatre cycles (A, B, C et D). Ces molécules sont majoritairement hydrophobes (Williams, 2024). Les stéroïdes sexuels sont principalement produits par les gonades mâles ou femelles, le placenta, les corticosurrénales et le tissu adipeux (Pugeat, 2021), aussi bien chez le mâle que chez la femelle. Il existe plusieurs classes de stéroïdes sexuels, dont les structures moléculaires sont très proches : les progestagènes, les androgènes et les œstrogènes. Des mécanismes d'oxydation, d'aromatisation, de sulfonation ou autres vont faire passer ces composés d'une classe à une autre. Parmi les principaux stéroïdes sexuels produits durant la gestation des ruminants, on retrouve la P4, l'E1 et l'E1S. La figure 8 montre les principales voies de production des différents stéroïdes sexuels à partir du cholestérol.

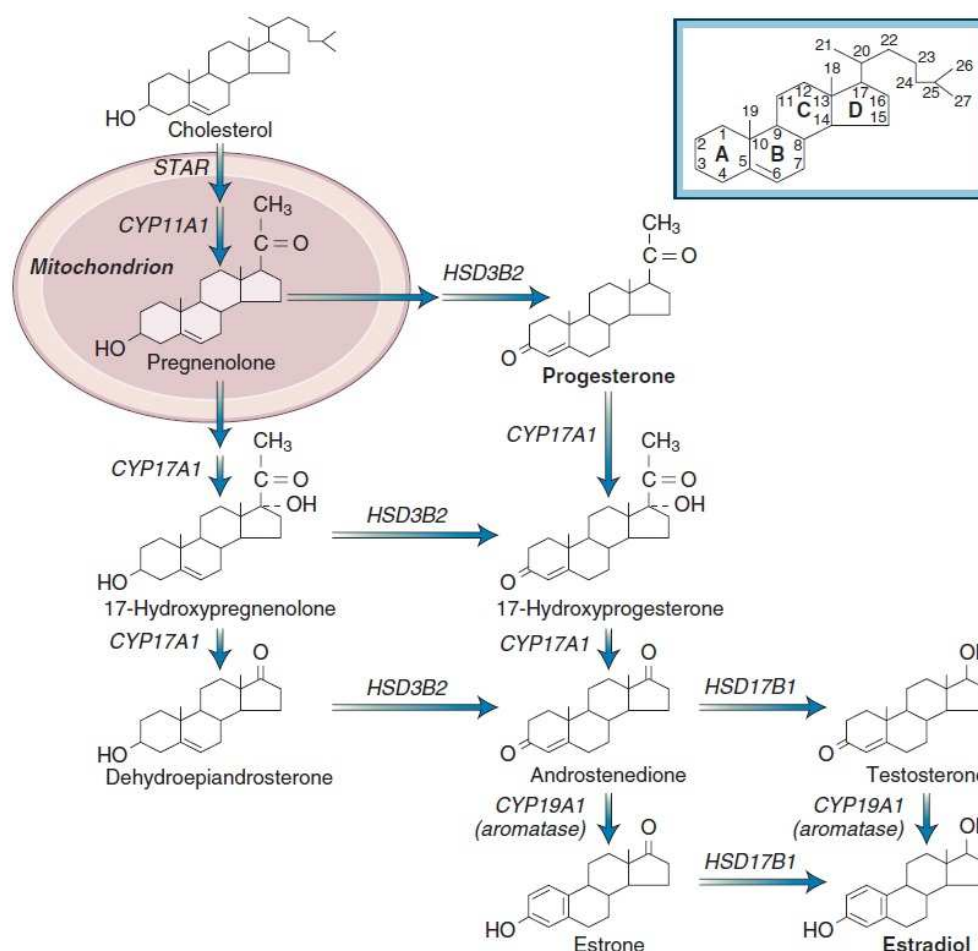


Figure 8 : Voies de synthèse des différents stéroïdes sexuels (Williams, 2024).

2.2.1 Progestérone et ses métabolites

La progestérone fut décrite pour la première fois en 1901 comme une substance endocrine produite par le corps jaune qui maintient la gestation (Fraenkel et Cohn, 1901 ; Magnus, 1901).

2.2.1.1 Structure

La P4 est une hormone stéroïdienne de formule chimique $C_{21}H_{30}O_2$. Sa structure est constituée d'un squelette pregnane à 21 carbones (C21) caractérisant les progestatifs endogènes. La prégnénolone est un précurseur des progestagènes, des alcools pregnaniques et de plusieurs hormones corticostéroïdes.

2.2.1.2 Production

La P4 est synthétisée à partir du cholestérol sous l'action de la LH par les grandes et les petites cellules lutéales du CJ (Shemesh, 1990). Les grandes cellules lutéales dérivent de la granulosa du follicule et transforment le cholestérol en hormones stéroïdiennes. Elles sont les principales productrices de la P4 (Williams, 2024). Les petites cellules lutéales sont issues de la thèque interne et possèdent de grandes quantités de gouttelettes lipidiques qui servent de réserve de cholestérol, précurseur de la synthèse de P4 (Wiltbank *et al.*, 2014). Les grandes cellules produisent un éventail plus large de stéroïdes que les petites cellules, plus spécialisées dans la production de P4 (Chouhan *et al.*, 2014). En effet, la P4 augmente au moment de la mise en place du CJ et reste élevée jusqu'à la lutéolyse de celui-ci en cas de non-gestation, soit pendant plus de 16 jours (Nebel, 1988). La P4 reste élevée en cas de gestation mais aussi en cas de kystes folliculaires lutéinisés ou de CJ persistant (Terblanche et Labuschagne, 1981). Chez la vache (BT), le placenta produit lui aussi de la P4 à faible concentration, contribuant aux concentrations de P4 sérique (Meyer, 1994 ; Schuler *et al.*, 2008). Il s'agit de la principale source extra-ovarienne de P4 durant la gestation. Sa synthèse est réalisée par les cellules binucléées des cotylédons fœtaux (Shemesh, 1990). Cette biosynthèse placentaire de P4 est dépendante du Ca^{2+} (Shemesh, 1990) qui apparaît être un second messenger, responsable de la régulation de la biosynthèse de la P4 dans le placenta du BT (Shemesh, 1990).

2.2.1.3 Action

La P4 stimule et maintient les fonctions endométriales nécessaires à la croissance du conceptus, à son implantation (Satterfield *et al.*, 2008), au développement de la vascularisation de l'endomètre et à l'hypertrophie de glandes utérines, donnant cet aspect dentelé et contourné de la paroi utérine (Wiltbank *et al.*, 2014). La P4 a aussi un rôle d'immuno-modulation chez la vache (BT) (Batool *et al.*, 2025). Il a plus particulièrement été observé que la P4 inhibait la prolifération lymphocytaire dans l'endomètre dès le début de l'implantation, diminuait le nombre de macrophages dans l'utérus ainsi que leur activité phagocytaire et stimulait la production de prostaglandine E2 (PGE2) qui possède une action immunosuppressive. Les effets de la P4 et de la PGE2 sur l'inhibition des lymphocytes sont d'ailleurs synergiques (Batool *et al.*, 2025 ; Martal *et al.*, 1997). En effet, l'interleukine-1 est produite par l'embryon, le trophoblaste et l'endomètre chez les ruminants (Batool *et al.*, 2025). En début de gestation, la sécrétion d'interleukine-1 est d'abord stimulée par le plasma séminal, puis il est possible que les œstrogènes et la P4 stimulent sa production pendant l'implantation. L'interleukine-1 semble nécessaire à la réussite de l'implantation et de la gestation.

Chez l'humain, 5% de la P4 plasmatique sont libres et 95% sont liés à des protéines de transport : 50 à 54% à l'albumine, 43 à 48% à la transcortine ou globuline liant le cortisol (CBG), le reste étant lié à une globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) (Litwack, 2022). Les proportions de liaison aux protéines de transport chez les mammifères présentent de légères différences, mais il y a peu de données à ce sujet dans la littérature pour les ruminants.

2.2.1.4 Élimination

Chez les ruminants, la progestérone (P4) est métabolisée dans le foie en fonction du flux sanguin hépatique. Ce métabolisme se déroule en deux phases : une première phase de réduction, au cours de laquelle la P4 est transformée en métabolites inactifs, tels que les pregnanediols et les pregnanolones, par hydroxylation (Wiltbank *et al.*, 2014). Une seconde phase de conjugaison suit, où ces métabolites sont combinés avec des glucuronides ou des sulfates, ce qui les rend hydrophiles et facilite leur élimination (Wiltbank *et al.*, 2014). Une fois conjugués, ces métabolites sont excrétés par les urines (50-60 %) et par le système entéro-hépatique (environ 10 %), tandis que le reste est récupéré par les *organic soluble transporters* (OST) pour être redirigé vers la circulation porte (Sitruk-Ware, 2018). Le temps de demi-vie de la P4 est en moyenne de 64 à 24 minutes pour des vaches laitières BT consommant une ration riche en fibres. Elle est en moyenne de 85 pour des vaches consommant une ration riche en fécule de maïs et de 73 minutes pour des vaches consommant une ration riche en fibres (Lemley *et al.*, 2010a ; Lemley *et al.*, 2010b).

Chez les ruminants, le délai d'excrétion des métabolites de la P4 est estimé entre 12 et 24 heures (Kumar et al., 2013). Le foie des ruminants a la capacité de métaboliser efficacement la P4 et de former des conjugués glucuronides, avec une participation active des tissus adipeux dans ces processus (Clemens et Estergreen, 1982). Parmi les métabolites de la P4, le 5 α -prégnane (produit à partir de la P4 par la 5 α -réductase) est principalement excrété dans les matières fécales sous forme de conjugués, avec un décalage de 12 à 24 heures par rapport aux concentrations sanguines de P4 (Schwarzenberger et al., 1996 ; Sevalilis et al., 1997). Les concentrations fécales de 5 α -prégnane sont fortement corrélées aux concentrations sériques de P4, bien que la concentration fécale puisse être influencée par des variations du régime alimentaire et notamment la quantité de matière sèche ingérée (Schwarzenberger et al., 1997). Ainsi, le dosage du 5 α -prégnane dans les matières fécales offre une alternative non invasive pour évaluer la cyclicité ou comme outil de diagnostic de gestation précoce (Kumar et al., 2013). Un autre métabolite de P4 que l'on retrouve dans les MF est l'alloprégnénolone. Il est dérivé de la P4 par la 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase principalement au niveau du CJ et secondairement au niveau du placenta et des glandes surrénales (Cardone *et al.*, 2026). Ce dérivé de la P4 a des effets sur la croissance folliculaire et pourrait donc être utilisé dans le suivi de la cyclicité chez les animaux sauvages. Chez le BT, les concentrations sériques en alloprégnénolone sont plus élevées en phase lutéale ; ses concentrations restent élevées durant la gestation et chutent rapidement après la mise-bas. Durant la gestation, ce dérivé de la P4 diminue les contractions utérines. Il a aussi des actions sur le fœtus, empêchant des effets délétères des glucocorticoïdes de la mère sur le cerveau du fœtus. Il a aussi un rôle sur le système nerveux central et sur la capacité de l'animal à s'adapter aux stress qu'il rencontre (Cardone *et al.*, 2026).

2.2.1.5 Évolution des concentrations sériques

Chez la vache *Bos taurus* (BT), les concentrations sanguines de P4 sont comprises entre 3 et 8 ng/mL durant la gestation. La concentration de P4 redevient inférieure à 1 ng/mL 48 à 24 heures avant la mise-bas (Terblanche et Labuschagne, 1981). Le dosage de la P4 dans le sang, l'urine ou le lait peut être utilisé pour le diagnostic de gestation précoce. Si utilisé en dosage unique et en utilisant que la P4, la faible spécificité de ce dosage (Nebel, 1988) ainsi que les variations de P4 au cours du cycle (Terblanche et Labuschagne, 1981) ne permettent pas de poser un diagnostic de gestation fiable. Chez le BT, il existe aussi une forte variation individuelle des concentrations de P4 au cours du cycle et de la gestation, dépendant, entre autres, du nombre et de la taille des CJ, du flux sanguin hépatique mais aussi des précurseurs de la P4 dans l'ovaire (Wiltbank *et al.*, 2014). Une concentration de P4 sérique ou dans le lait élevée signifie que la vache BT est cyclée ou qu'elle est gestante. Par contre, une

concentration basale de P4 dans le sérum (<1 ng/mL) ou dans le lait est un marqueur de non-gestation, la P4 étant indispensable tout au long de la gestation chez les ruminants (Nebel, 1988). Chez *Bubalus bubalis* (BB), la concentration de P4 durant la gestation est similaire à celle du BT (Batra *et al.*, 1979). Chez le bison d'Amérique (AmB), une étude menée en 1991 sur cinq femelles bisons non gestantes a montré des concentrations sériques de P4 allant de 0,9 à 10,1 ng/mL en diœstrus et ces concentrations étaient corrélées à l'élimination urinaire du 3d glucoronide (Kirkpatrick *et al.*, 1991). Le tableau IV résume les données relatives à l'évolution de la concentration sérique en P4 durant la gestation.

Tableau IV : Données détaillées disponibles relatives à la progestérone (P4) chez *Bos taurus*, *Bubalus bubalis* et *Bison bison bison* (concentrations moyennes $\pm$ déviation standard)

Espèce	Stade physiologique	Concentrations (ng/mL)	Méthodes	Références
<i>Bos taurus</i>	15j post œstrus	4-7	ELISA	Terblanche et Labuschagne, 1981
	100j de gestation	4-7		
	150j de gestation	3-8		
	280 j de gestation	3-4		
	3j post-partum	<1		
<i>Bubalus bubalis</i>	13j post œstrus	3,6 ± 1,7	RIA	Batra <i>et al.</i> , 1979
	Durant la gestation	Similaire à la vache		
<i>Bison bison bison</i>	Pas de données disponibles			

2.2.2 Œstrone et Sulfate d'œstrone

L'œstrone a été découverte par Allen et Doisy en 1923, tandis que le sulfate d'œstrone a été découvert dans les années 1970.

2.2.2.1 Structure

L'E1 et l'E1S font partie de la famille des œstrogènes, comprenant aussi l'œstradiol (E2) et l'œstriol (E3), ainsi que d'autres composés atypiques comme l'équiline ou l'équilinine. La formule chimique de l'E1 est $C_{18}H_{22}O_2$ et sa structure est composée d'un noyau œstrane caractérisé par un noyau A aromatique (Taieb et Lachgar-Keltoum, 2011). La conjugaison de l'E1 avec un groupement sulfate sur le carbone 3 par l'enzyme sulfotransférase résulte en la production d'E1S (Geyer *et al.*, 2017).

2.2.2.2 Production

Les œstrogènes sont majoritairement produits par les ovaires et le placenta (Senger, 2015), mais également par le testicule chez certaines espèces, et en petites quantités par d'autres tissus comme le foie, la corticosurrénale et le tissu adipeux (Senger, 2015).

Pendant l'œstrus, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) stimule la production ovarienne d'E2 par les cellules de la granulosa des follicules (Williams, 2024). La synthèse des œstrogènes débute dans les cellules de la thèque interne par la synthèse à partir du cholestérol d'un androgène, l'androsténédione. Ce composé traverse la membrane basale pour atteindre les cellules de la granulosa, où il est converti soit immédiatement en E1, soit en testostérone puis en E2 lors d'une étape supplémentaire (Senger, 2015). La conversion de l'androsténédione en testostérone est catalysée par la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD), tandis que la conversion de l'androsténédione et de la testostérone respectivement en E1 et en E2 est catalysée par une aromatasase (*figure 8*).

La production des œstrogènes placentaires dépasse de loin celle d'origine ovarienne. Chez les BT, comme chez d'autres ruminants ou les équidés, les cellules du trophoblaste du placenta produisent des œstrogènes dont l'E1S est le principal représentant (Hoffmann et Schuler, 2002). Une production cotylédonaire d'œstrogènes a été détectée chez le BT dans les liquides utérins dès le 33^{ème} jour de gestation (Hoffmann *et al.*, 1997). La concentration sérique en E1S reste faible jusqu'au 100^{ème} jour de gestation pour augmenter progressivement et atteindre $28,4 \pm 3,1$ ng/mL le jour avant le vêlage (Shah *et al.*, 2006). L'E1 est considérée comme un précurseur ou une pro-hormone de l'E2 car la majeure partie, voire la totalité, de l'activité œstrogénique de l'E1 *in vivo* est due à sa conversion en E2 (Senger, 2015). L'E1S est une forme d'élimination et de réserve de l'E1 sous forme inactivée et hydrophile en particulier durant la gestation chez le BT (Hoffmann et Schuler, 2002).

2.2.2.3 Action

Chez la vache BT et durant le cycle, l'augmentation de la concentration en œstrogènes, principalement produite par une vague de croissance folliculaire, contribue à la lutéolyse, menant à la dégradation du CJ producteur de P4 (Mellin et Erb, 1965). En effet, les quantités croissantes d'E2 participent à l'induction de la libération de prostaglandines endométriales, favorisant ainsi la régression lutéale (Williams, 2024). À mesure que le CJ régresse, la sécrétion de P4 diminue, permettant une vague de croissance folliculaire et la production d'E2. Celui-ci va stimuler la transcription rapide des récepteurs de l'ocytocine dans l'utérus. Chez le BT, l'E2 agit comme un potentialisateur (amplificateur) primaire dans la cascade de la lutéolyse (Rio Feltrin *et al.*, 2024). En augmentant la sensibilité à l'ocytocine de l'endomètre utérin, l'E2

déclenche une libération massive et pulsatile de prostaglandine F2 α , ce qui entraîne ensuite la régression structurelle et fonctionnelle du CJ (Rio Feltrin *et al.*, 2024). Le calcium potentialise l'effet de l'E2 sur la production de prostaglandine F2 α dans l'endomètre du BT, garantissant ainsi un signal lutéolytique robuste (Rio Feltrin *et al.*, 2024).

Durant la gestation, les œstrogènes placentaires joueraient un rôle dans la régulation de la fonction caronculaire et de la croissance fœtale (Hoffmann et Schuler, 2002). Ils interviendraient dans la stimulation et le maintien de la nutrition du fœtus par les placentomes (Hoffmann et Schuler, 2002). Cependant, ces effets restent encore mal compris. Lors de la mise en place des mécanismes de la mise-bas en période de pré-partum, à mesure que la concentration sanguine de P4 diminue, les œstrogènes facilitent les contractions utérines et la dilatation cervicale (Grunert *et al.*, 1989), préparant ainsi l'expulsion du fœtus. De plus, les œstrogènes contribueraient à supprimer l'activité des cellules NK pendant la gestation (Gabrilovac *et al.*, 1988). Les œstrogènes sembleraient également avoir un effet négatif sur la différenciation, la prolifération et la survie des cellules précurseurs des lymphocytes B (Medina *et al.*, 2000).

Longtemps considéré comme une réserve hormonale inactive qui sert de réservoir d'E2 ou comme métabolite d'excrétion, l'E1S joue un rôle sur les cellules folliculaires et sur la capacité de développement des ovocytes chez le BT (Geyer *et al.*, 2017). L'E1S peut aussi déclencher des mécanismes identiques à sa version non sulfatée, en étant activement introduit dans la cellule par un transporteur membranaire, le *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT). Dans certains tissus cibles comme le placenta, la glande mammaire ou les ovaires, l'E1S peut soit directement, soit après désulfonation, déclencher les mêmes cascades hormonales que l'E1 (Geyer *et al.*, 2017). Chez la BT gestante, le placenta convertit la majorité de l'E1 en E1S. Contrairement à l'E1, l'E1S est hydrosoluble et ne peut donc pas passer la membrane cellulaire, nécessitant donc un co-transport actif pour son incorporation dans la cellule où il peut être réactivé en E1 (*figure 9*).

Chez l'humain, seulement 5 % de l'œstrone (E1) circulent sous forme libre, le reste étant majoritairement lié à l'albumine (85 %) ou à la Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) (8 %) (Grow, 2002). La demi-vie du sulfate d'œstrone est beaucoup plus longue (cinq à neuf heures) que celle de l'œstrone (moins de 20 minutes) (Longcope, 1972 ; Ruder *et al.*, 1972 ; Dessypris, 1975).

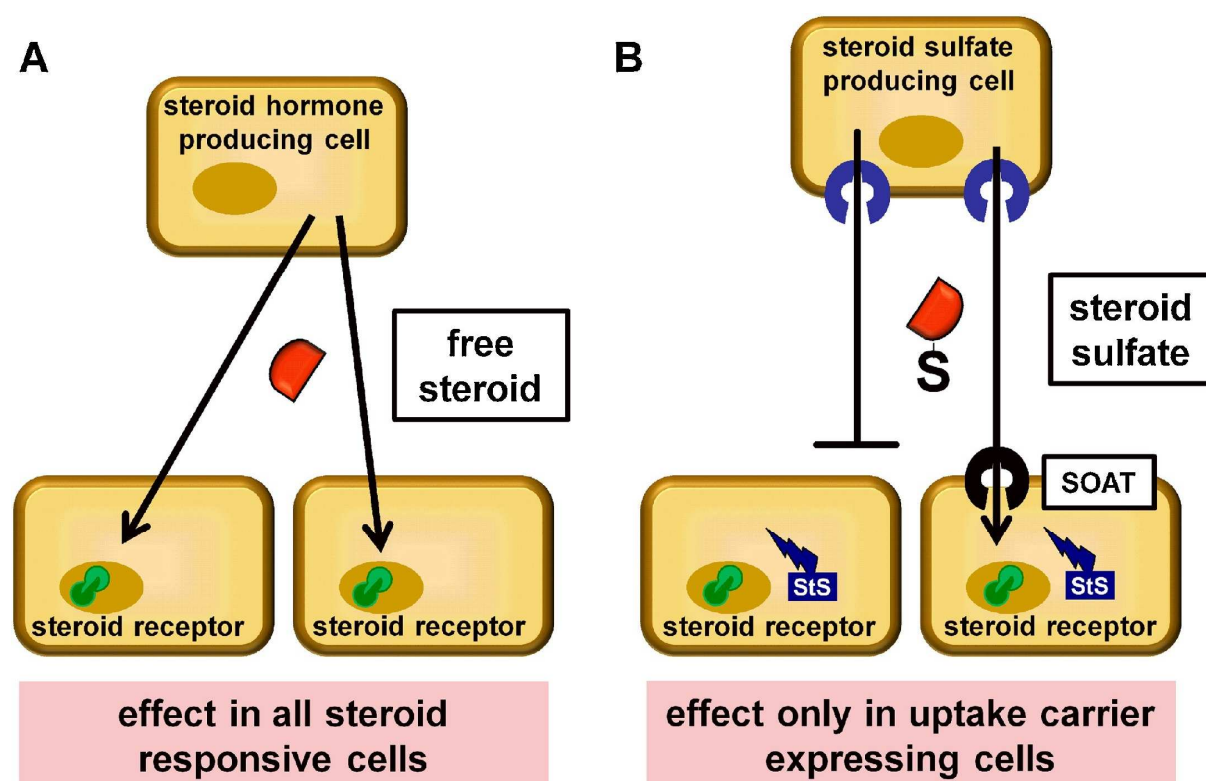


Figure 9 : Transport des œstrogènes conjugués et non conjugués (Geyer et al., 2017). La figure A montre le passage des hormones stéroïdiennes à travers la paroi de la cellule cible sans nécessité de cotransport et l'activation des mécanismes dans la cellule cible. La figure B montre l'action d'un transporteur membranaire pour les stéroïdes sulfatés, le Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT). Sans ces transporteurs, le stéroïde sulfaté n'entraîne aucun mécanisme hormonal alors qu'une cellule cible présentant ces transporteurs permet l'activation dans la cellule des réponses hormonales. La stéroïde sulfatase (STS) est l'enzyme qui permet l'activation du sulfate d'œstrone dans la cellule.

2.2.2.4 Élimination

Les œstrogènes sont principalement excrétés par l'urine et par la bile sous forme de conjugués. Chez les animaux cyclés, l'E2 est déshydrogéné par la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase en E1, principalement par le foie, mais aussi par d'autres tissus comme les glandes surrénales, le tissu adipeux, la peau et le cerveau, (Hendricks, 1976). Les œstrogènes sont ensuite métabolisés dans le foie d'abord par hydroxylation grâce aux enzymes du cytochrome P450 telles que CYP1A1 et CYP3A4 puis par conjugaison grâce aux œstrogènes sulfotransférases (sulfonation) et aux UDP-glucuronyltransférases (glucuronidation) (Melmed et al., 2024). Cette transformation a lieu principalement dans le foie, mais aussi un peu dans les reins chez les animaux cyclés (figure 10). L'excrétion urinaire des œstrogènes représente 25 à 40 % de l'excrétion totale, le reste étant éliminé par les matières fécales (Mellin, 1966). Comme la production *de novo* d'hormones dérivées du cholestérol est énergivore, un cycle entéro-hépatique permet la réabsorption des dérivés œstrogéniques conjugués, comme l'E1S,

pour les rediriger vers la circulation hépatique (Ballatori *et al.*, 2013; Soroka *et al.*, 2010). Ce mécanisme est réalisé grâce aux *organic soluble transporter* (OST) α et β : 90 à 95% des formes conjuguées sont réabsorbées vers la circulation porte (*figure 11*) et moins de 10% sont finalement excrétées dans les matières fécales (Geyer *et al.*, 2017).

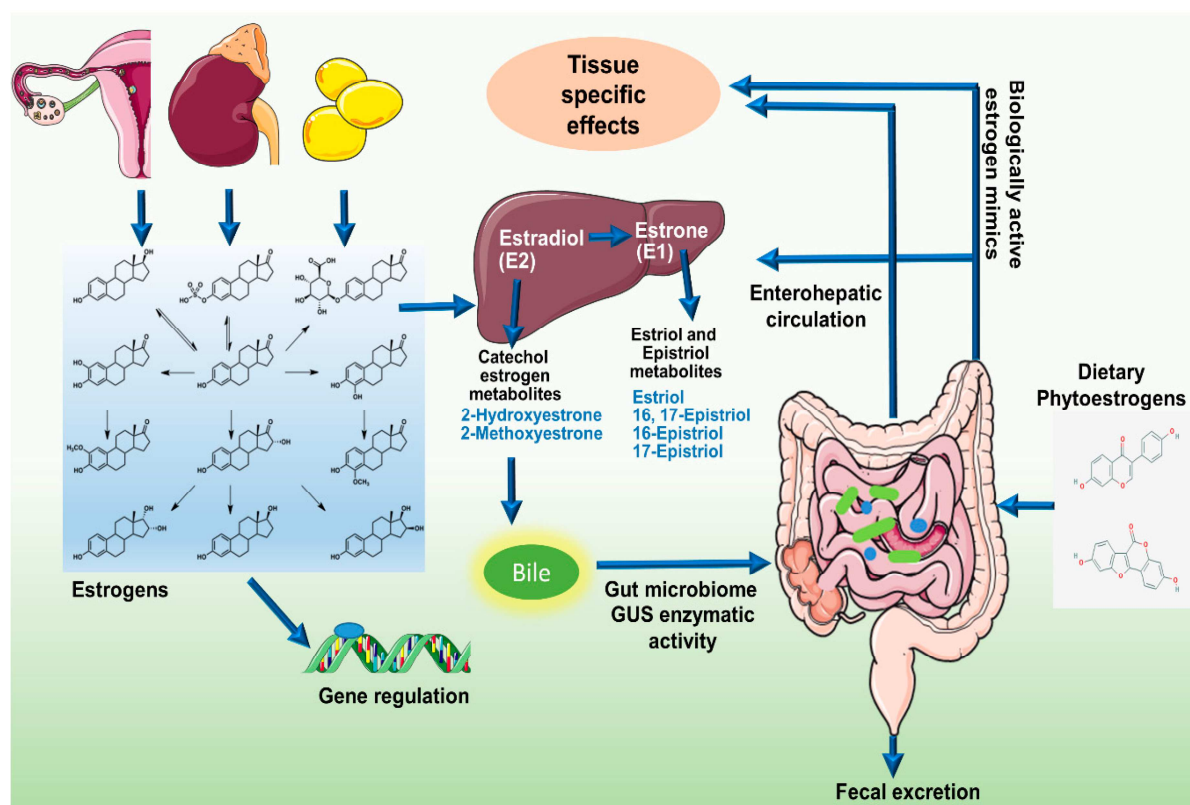


Figure 10 : Voies de production et d'élimination des œstrogènes. L'enzyme β -glucuronidase (GUS) présente dans le microbiote intestinal est un biocatalyseur microbien qui module l'activité et la disponibilité d'une large gamme de composés glucuronés (Parida *et Sharma*, 2019).

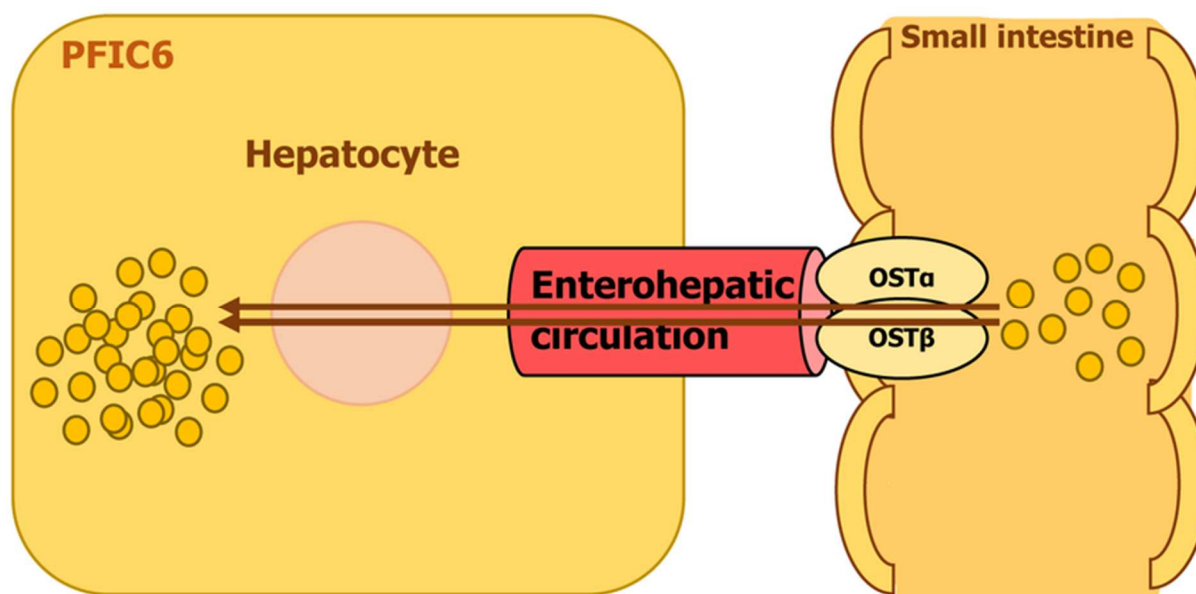


Figure 11 : Schéma de fonctionnement de l'organic soluble transporter (OST) et réabsorption des hormones stéroïdiennes par la circulation porte. Les points jaunes représentent les dérivés œstrogéniques comme l'E1S et leur réabsorption dans la circulation porte. (Mkarem et al., 2025).

2.2.2.5 Évolution des concentrations sériques durant la gestation

Chez les vaches BT, les concentrations d'E1 et d'E2 restent faibles (1 à 5 pg/mL) jusqu'au jour 80 post-conception (Hirako *et al.*, 2002). Entre le 80^{ème} et le 100^{ème} jour de gestation, la concentration d'E1S augmente plus rapidement que celles d'E1 et d'E2 (Hirako *et al.*, 2002). Au cours des dernières semaines de gestation, l'E1 commence à augmenter, atteignant des concentrations presque équivalentes à l'E1S immédiatement avant la parturition (Eley *et al.*, 1979 ; Hoffmann *et al.*, 1997). La figure 12 illustre l'augmentation de l'E1S et de l'E2 chez le BT durant la gestation et en post-partum. Chez la vache gestante (BT), l'E1S est présente dans le sang, les matières fécales, l'urine et le lait à des concentrations suffisantes pour différencier les vaches gestantes des vaches non gestantes après environ 100 jours de gestation (Hoffmann *et al.*, 1997). Chez les BB, les femelles gestantes présentent des concentrations d'E1S sériques faibles jusqu'au 4^{ème} mois de gestation, pour augmenter et atteindre 6,6 ng/mL au 10^{ème} mois de gestation (Hung et Prakash, 1990). Chez l'AmB, la concentration d'œstrogènes fécaux totaux, dosée par RIA, est de 0,20 ng/g chez de femelles non gestantes et de 1,09 ng/g chez des femelles gestantes (n=14) à trois mois de gestation (Kirkpatrick *et al.*, 1992). Les tableaux V et VI résument les données disponibles relatives à l'évolution de la concentration sérique en E1 et en ES1 durant la gestation.

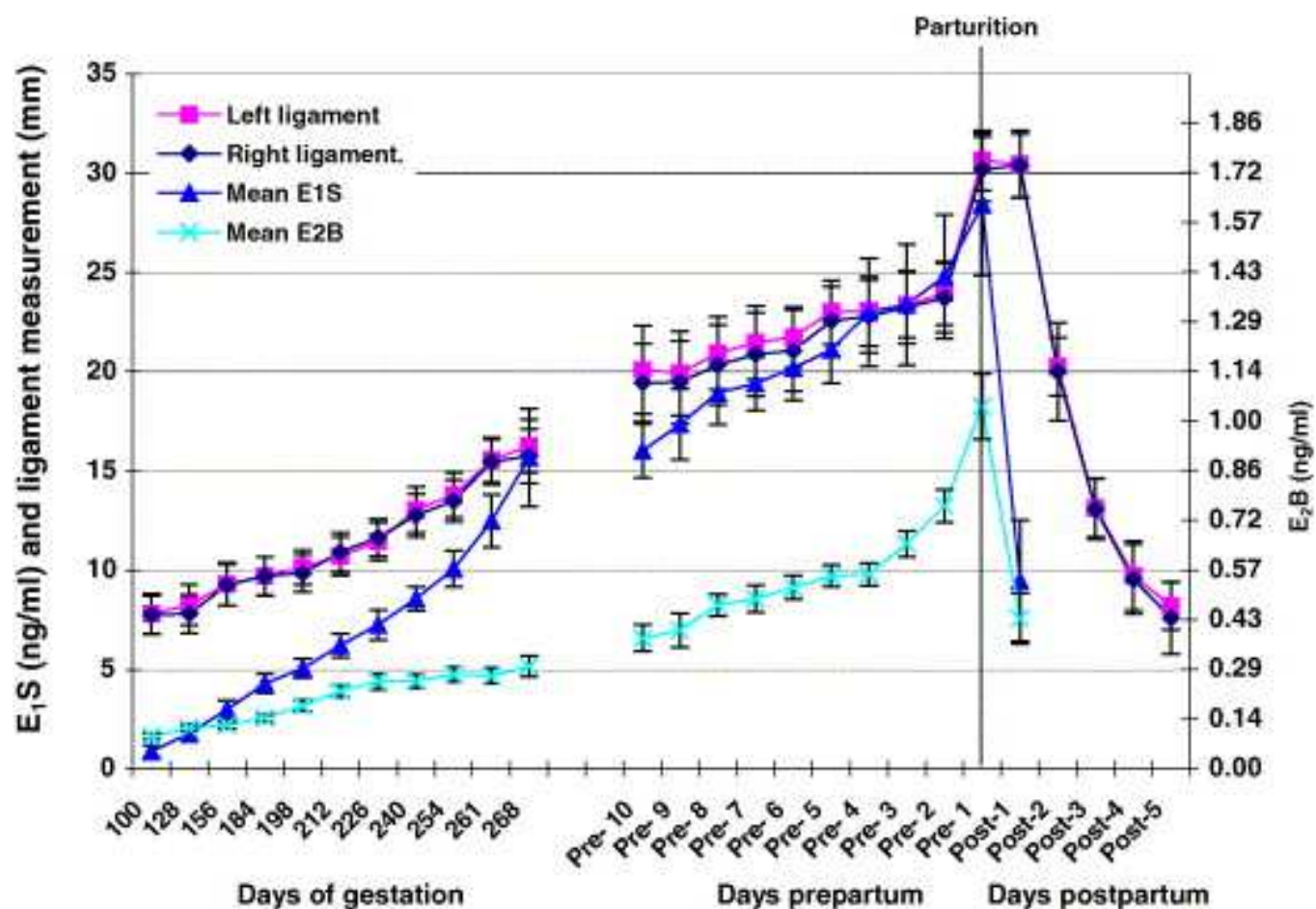


Figure 12 : Profils plasmatiques en sulfate d'œstrone (E1S) et en œstradiol (E2) chez des vaches Holstein-Frissonnes du 100e jour de gestation jusqu'au premier jour du post-partum, et évolutions concomitantes de la relaxation des ligaments sacro-ischiatiques (Shah et al., 2006).

Tableau V : Données disponibles pour la concentration d'œstrone (E1) chez *Bos taurus*, *Bubalus bubalis* et *Bison bison bison* (concentrations moyennes)

Espèce	Jours de gestation	Concentrations (pg/mL)	Méthodes	Références
<i>Bos taurus</i>	80	1-5	RIA	Hirako <i>et al.</i> , 2002
	280	8,3		
<i>Bubalus bubalis</i>	Pas de données disponibles			
<i>Bison bison bison</i>	Pas de données disponibles			

Tableau VI : Données disponibles pour la concentration de sulfate d'œstrone (E1S) chez *Bos taurus*, *Bubalus bubalis* et *Bison bison bison* (concentrations moyennes $\pm$ déviation standard)

Espèce	Jours de gestation	Concentrations (ng/mL)	Méthodes	Références
<i>Bos taurus</i>	100	0,7 $\pm$ 0,1	HPLC + RIA	Hoffmann <i>et al.</i> , 1997
	240	8,5 $\pm$ 0,6		
	268	15,7 $\pm$ 2,5		
	280	28,4 $\pm$ 3,6	ELISA	Shah <i>et al.</i> , 2006
	1j post-partum	9,4 $\pm$ 3,1		
<i>Bubalus bubalis</i>	300j de gestation	6,6		Hung et Prakash, 1990
<i>Bison bison bison</i>	Pas de données disponibles			

3. Matrices et méthodes de dosage

Parmi les nombreuses molécules présentes dans les matrices biologiques, les hormones ou les protéines spécifiques constituent des indicateurs biologiques essentiels pour déterminer le statut reproducteur des animaux. Leur dosage permet d'obtenir des informations sur l'activité endocrinienne associée aux ovaires et/ou à la gestation. Dans le cadre du suivi de la reproduction chez les ruminants, la quantification de marqueurs hormonaux tels que la P4 permet de suivre la cyclicité. La quantification des concentrations de P4, d'E1S ou des PAGs permet quant à elle d'identifier les femelles gestantes ou non et dans certains cas, d'évaluer le stade de la gestation.

Ces molécules peuvent être dosées dans différentes matrices biologiques. Le sérum est historiquement la matrice de référence, car il reflète directement les concentrations circulantes. Toutefois, obtenir du sang nécessite une contention, ce qui est difficile et dangereux chez des espèces peu ou pas manipulables. Le lait et l'urine sont aussi des matrices biologiques facilement accessibles chez des animaux domestiqués, mais difficiles à récolter sur des animaux qui ne le sont pas. À l'inverse, les matières fécales constituent une matrice facilement accessible quel que soit le niveau de domestication. Elles contiennent des métabolites hormonaux issus de l'élimination digestive des hormones circulantes, permettant de suivre l'état reproducteur des animaux sans nécessairement demander une contention.

Le choix de la matrice biologique dépend donc d'un compromis entre facilité d'échantillonnage, bien-être animal et qualité des informations endocriniennes recherchées. Chez des espèces non domestiquées telles que l'AmB, le développement d'outils diagnostiques utilisant des matrices non invasives représente un enjeu majeur pour les élevages extensifs et les programmes de conservation. Cependant, la faible concentration de certaines hormones sexuelles, leur proximité structurelle avec d'autres stéroïdes et le métabolisme intestinal de ces hormones imposent le recours à des méthodes analytiques présentant de hautes sensibilités, spécificités et répétabilités.

3.1 Terminologie

En chimie analytique, l'analyte représente le composé que l'on veut qualifier et quantifier tandis que la matrice désigne tous les éléments de l'échantillon qui ne sont pas l'analyte. En effet, les échantillons biologiques contiennent de nombreux composés de différentes natures (protéines, lipides, glucides, minéraux, etc.) qui interfèrent avec les propriétés des analytes. L'environnement chimique peut affecter le signal de l'analyte lors de sa détection ou de sa quantification et la concentration des analytes est parfois très faible par rapport à celle des

substances interférentes. Cet effet matrice peut être observé aux différentes étapes de l'analyse, notamment lors de la préparation de l'échantillon, de la séparation et de la détection. Les effets de matrice peuvent entraîner des erreurs significatives dans les résultats analytiques, notamment pour la quantification. Différentes approches peuvent être utilisées pour atténuer ou corriger l'effet matrice, notamment l'utilisation d'étalons internes, la dilution de l'échantillon ou l'utilisation d'extractions sélectives comme l'extraction en phase solide (SPE) (An *et al.*, 2020 ; Williams *et al.*, 2023). La réduction de l'effet matrice nécessite une préparation des échantillons avant l'analyse pour fournir des résultats fiables et précis (Zongliang *et al.*, 2018).

Toute méthode utilisée pour mesurer la concentration d'une substance possède des caractéristiques inhérentes qui sont décrites comme « analytiques » pour les distinguer des caractéristiques « diagnostiques » du test en découlant. Les principales caractéristiques analytiques sont la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), la répétabilité et la reproductivité.

La sensibilité analytique d'un test est sa capacité à réduire les faux négatifs en détectant une faible concentration d'une substance donnée, comme par exemple une hormone, dans un échantillon biologique, et avec une grande fiabilité. La limite minimale de détection (LMD) est la plus faible concentration d'un analyte qu'un test est capable de détecter, mais pas nécessairement de quantifier de manière fiable (Oleneva *et al.*, 2019). Plus elle est faible, plus la sensibilité analytique est élevée. La limite de quantification inférieure (LLOQ) désigne la plus petite quantité ou concentration d'une substance pouvant être déterminée par une procédure analytique donnée avec l'exactitude, la précision et l'incertitude établies. La LLOQ doit être estimée à l'aide d'une mesure ou d'un échantillon standard approprié ; elle ne peut être prédite et doit faire l'objet d'une procédure pré-analytique (Lister, 2005). La limite supérieure de détection est la plus haute concentration mesurable de manière fiable et linéaire par la méthode. La sensibilité analytique peut également être exprimée en termes de capacité d'un test à détecter une variation de concentration. Plus la variation détectable est faible, plus la sensibilité analytique est élevée. De son côté, la spécificité analytique est la capacité d'un test à identifier exclusivement une substance plutôt que les substances structurellement proches mais différentes dans un échantillon, comme l'E1 et l'E2. Une haute spécificité réduit les faux positifs.

La répétabilité analytique, ou de mesure, est la capacité d'une méthode à donner des résultats similaires lorsqu'on répète la mesure dans les mêmes conditions, sur un court intervalle de temps. Elle est un aspect crucial de la qualité des analyses, reflétant la précision intra-essai. La reproductibilité correspond à l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même

échantillon soumis à l'essai dans des conditions différentes : utilisateur différent, appareil différent, jour différent (Longtin *et al.*, 2018). La reproductibilité reflète la précision inter-essai.

Le biais désigne le degré d'inexactitude, c'est-à-dire l'erreur systématique, tandis que la variabilité correspond au degré d'imprécision, c'est un indicateur de dispersion (*figure 13*).

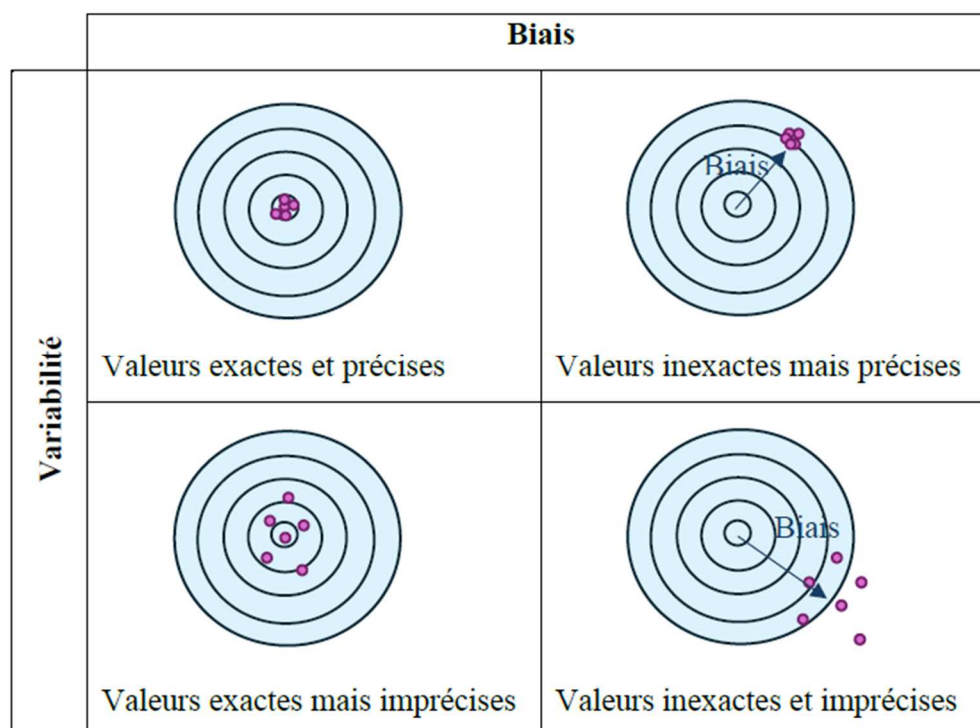


Figure 13 : Variabilité et biais de méthodes diagnostiques (Merrer, 2022)

D'un point de vue technique, le multiplexage analytique permet de quantifier plusieurs analytes simultanément, en utilisant une seule méthode. Cela permet d'obtenir plusieurs résultats par analyse, en permettant une meilleure compréhension des processus biologiques ou pathologiques, tout en réduisant le temps et les coûts d'analyse (Lakomy et Olsson, 2008) et les volumes d'échantillon nécessaires (Koren *et al.*, 2012).

3.2 La phase d'extraction

La préparation des échantillons est primordiale pour obtenir une solution contenant les analytes qui permet d'obtenir des résultats fiables et précis. Cette phase poursuit des objectifs importants en amont de l'analyse de l'échantillon : réduire ou éliminer les interférences de matrice ou les composés endogènes indésirables, accroître la sélectivité pour le(s) analyte(s) ciblé(s), préconcentrer l'échantillon pour améliorer la sensibilité et, enfin, stabiliser l'échantillon dans un solvant inerte (Zongliang *et al.*, 2018). Une tendance importante, commune aux recherches fondamentales sur les techniques de préparation des échantillons, concerne le

développement de méthodes de préparation plus exactes, précises, sélectives et robustes (Zongliang *et al.*, 2018).

Les stéroïdes sexuels sont lipophiles et liés dans le sérum à l'albumine, à la SHBG ou à la transcortine dans des proportions différentes. Ces liaisons impliquent qu'une phase d'extraction est nécessaire. Il existe plusieurs méthodes d'extraction parmi lesquelles on peut citer la précipitation des protéines, l'extraction en phase solide et l'extraction en phase liquide (French, 2016).

La précipitation des protéines se réalise habituellement avec un solvant organique, habituellement de l'acétonitrile, qui va simplement précipiter les protéines et libérer les hormones lipophiles qui y étaient liées. Cette technique simple, rapide et peu coûteuse, présente le désavantage de diminuer la sensibilité de la méthode d'analyse, car le solvant n'est pas complètement retiré de l'échantillon et peut dès lors générer des interférences avec le dosage des molécules ciblées (French, 2016).

L'extraction en phase solide se caractérise par la séparation entre une phase mobile et une phase solide. Les stéroïdes sexuels sont retenus grâce à un solvant sur la cartouche d'extraction. Le solvant est alors lavé plusieurs fois avec un solvant organique. Cette technique est plus longue que la précipitation des protéines mais garantit un échantillon de meilleure qualité (French, 2016).

L'extraction liquide-liquide repose sur la séparation entre deux liquides non miscibles, en règle générale de l'eau et un solvant. La centrifugation permet de récupérer le surnageant constitué du solvant et des stéroïdes sexuels. Cette technique est aussi longue que la SPE et garantit aussi un échantillon de meilleure qualité que la précipitation des protéines (French, 2016).

Pour l'extraction en phase solide et l'extraction liquide-liquide, les échantillons récupérés peuvent être asséchés avant d'être redilués pour l'analyse (French, 2016). La phase d'extraction peut être optimisée pour un stéroïde spécifique en utilisant un alcool ou un mélange d'alcools spécifiques (Wang *et al.*, 2020).

Si les méthodes décrites ci-dessus s'appliquent principalement aux stéroïdes sexuels lipophiles, liés à des protéines de transport comme l'albumine ou la SHBG, elles ne sont pas adaptées aux PAGs, glycoprotéines hydrophiles. Contrairement aux stéroïdes, les PAGs ne nécessitent pas de phase d'extraction complexe pour être libérées de leur matrice biologique (sérum, plasma, lait). Leur dosage repose généralement sur des techniques immunologiques directes (ELISA, RIA), après une simple dilution de l'échantillon, voire une précipitation légère pour éliminer les interférences non spécifiques, comme les lipides ou les débris cellulaires.

Cette divergence fondamentale dans la préparation des échantillons rend le dosage simultané (multiplex) de stéroïdes et de PAGs extrêmement difficile. Les solvants organiques (acétonitrile, méthanol) utilisés pour extraire les stéroïdes dénaturent les protéines comme les PAGs, les rendant indétectables. À l'inverse, les conditions douces nécessaires pour préserver l'intégrité des PAGs (pH neutre, absence de solvants organiques) ne permettent pas de libérer efficacement les stéroïdes de leurs protéines de transport. Même en optimisant des protocoles hybrides, la sensibilité et la spécificité des deux types de molécules seraient compromises, sans compter les risques de contamination croisée ou de perte de rendement. Ainsi, en pratique, les dosages de stéroïdes et de PAGs sont réalisés séparément, avec des protocoles dédiés à chaque famille de molécules.

3.3 Les dosages immunologiques

Ces dosages sont basés sur une réaction immunologique entre l'analyte à doser et un anticorps spécifique.

3.3.1 Radio-Immuno Assay (RIA)

Le RIA a été développé dans les années 1960-1970 pour les diagnostics médicaux et la recherche biomédicale (Goldsmith, 1975) afin de mesurer de faibles concentrations de substances biologiques, comme des hormones ou des principes actifs dans des échantillons. Il existe plusieurs types de RIA (direct, indirect, saturation, précipitation...). Dans cette section, seule la technique de RIA par compétition sera décrite, car c'est elle qui a été utilisée dans cette thèse. Le principe de fonctionnement du RIA se base sur la liaison compétitive d'un anticorps spécifique à une substance cible. Une version de l'antigène cible marquée radioactivement, avec, par exemple de l'iode-125, est ajoutée à l'échantillon. Les anticorps entrent en compétition pour fixer les antigènes, radioactivement marqués et non marqués de l'échantillon. Plus il y a d'antigène non marqué dans l'échantillon, moins l'antigène marqué se fixe à l'anticorps. Après incubation, les complexes antigène-anticorps sont séparés des antigènes libres (non liés). La radioactivité des complexes liés est mesurée à l'aide d'un détecteur. En comparant les résultats à une courbe standard (établie avec des concentrations connues d'antigène non marqué), on peut déterminer la quantité d'antigène dans l'échantillon (Goldsmith, 1975 ; Praither, 1985). La figure 14 illustre le principe de fonctionnement du RIA.

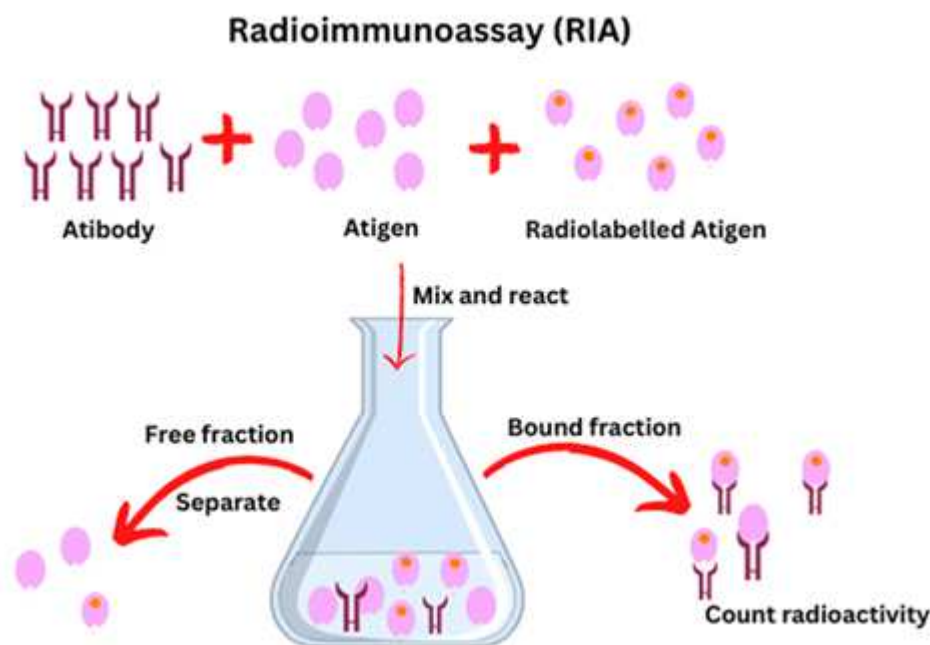


Figure 14 : Principe de fonctionnement du Radio-Immuno Assay (RIA) par compétition (Jyoti, 2023). Antibody = anticorps ; Antigen = antigène ; Radiolabelled Antigen = antigène marqué radioactivement ; Free fraction = fraction libre ; Bound fraction = fraction liée des anticorps et antigènes marqués ou non.

Un des avantages du RIA est de permettre de doser des analytes présents en faible quantité, de l'ordre du pg/mL (Goldsmith, 1975). Pour cette technique se basant sur une reconnaissance immunologique, la spécificité peut être limitée, car les anticorps peuvent fixer des molécules structurellement proches, surtout si elles sont de petite taille (Praither, 1985). De plus, cette méthode ne peut doser qu'un seul composé par analyse, étant donné qu'il faut un anticorps spécifique pour chaque molécule à doser. Le RIA impliquant le recours à des substances radioactives nécessitant des équipements et procédures spécialisés, il est de plus en plus remplacé par des tests ELISA (Praither, 1985 ; Weir, 1978).

3.3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Les tests ELISA sont largement utilisés en recherche biomédicale, en diagnostic clinique, notamment pour la détection de maladies infectieuses, la surveillance de réponses immunitaires, le dosage de cytokines et d'hormones (Crowther, 1995 ; Hayrapetyan *et al.*, 2023).

Les tests ELISA reposent sur la détection d'une réaction colorimétrique ou fluorométrique due à une enzyme fixée à des anticorps spécifiques. Il existe plusieurs types d'ELISA dont le choix variera en fonction de la substance cible (Hayrapetyan *et al.* 2023) :

- ELISA direct : l'antigène est immobilisé sur la plaque, et un anticorps conjugué à une enzyme est utilisé pour la détection. Cette méthode est rapide mais peut manquer de sensibilité.
- ELISA indirect : impliquant un anticorps primaire non marqué et un anticorps secondaire conjugué à une enzyme, cette méthode offre une sensibilité accrue grâce à l'amplification du signal.
- ELISA sandwich : deux anticorps spécifiques de l'antigène cible sont utilisés. L'antigène est "pris en sandwich" entre l'anticorps de capture et l'anticorps de détection. Cette méthode est hautement spécifique et sensible, idéale pour des échantillons complexes.
- ELISA compétitif : l'échantillon et un antigène marqué entrent en compétition pour la liaison à un anticorps spécifique. L'intensité du signal est inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

En comparaison du RIA, l'ELISA a comme avantage de ne pas utiliser de matériaux radioactifs pour l'analyse. Il s'agit d'une méthode de laboratoire sensible et spécifique. Cette méthode présente néanmoins les mêmes inconvénients de spécificité que le RIA pour des molécules très proches. Et comme le RIA, elle ne permet de doser qu'une seule molécule cible à la fois (Hayrapetyan *et al.*, 2023).

Historiquement, en médecine vétérinaire et humaine, les dosages hormonaux étaient réalisés par des méthodes immunologiques. Des études récentes (Dufour *et al.*, 2021) ont démontré les limites de spécificité et de sensibilité des dosages en RIA ou en ELISA pour le dosage d'hormones de petite taille et aux structures proches, comme les stéroïdes. En effet, au vu de la proximité structurelle de ces différentes hormones, les quantifications réalisées en utilisant ces tests sous-estiment ou surestiment les concentrations réelles (Tableau VII). Les techniques de détection physique des molécules comme la Chromatographie Liquide ou Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (respectivement LC ou GC-MS/MS) ou encore la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) peuvent permettre d'améliorer ces paramètres.

3.3.3 La Chromatographie couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS/MS)

La LC-MS/MS ou la GC-MS sont des techniques analytiques utilisées pour séparer, identifier et quantifier des analytes présents dans un mélange complexe sur base de leur structure moléculaire, en mesurant leur masse et leur polarité (Duarte *et al.*, 2023). Cette méthode ne repose donc plus sur une reconnaissance immunologique.

Lors de l'étape de séparation chromatographique, un extrait d'échantillon est introduit dans une phase mobile, un liquide ou un gaz, qui traverse une colonne contenant une phase stationnaire (généralement des particules solides). Les différents composés de l'échantillon interagissent différemment avec la phase stationnaire et sortent de la colonne à des temps différents : c'est le temps de rétention (Lämmerhoffer *et al.*, 2010). Le choix de la LC ou GC dépendra du type de composé que l'on souhaite doser. La LC peut doser des composés volatils ou solubles et travaille à basse température (20-85°C). La GC fonctionne à haute température (150-300°C) et ne dose que des composés volatils à ces températures (Duarte *et al.*, 2023 ; Dunn *et al.*, 2011).

Une fois les composés séparés par chromatographie, ils sont détectés par le spectromètre de masse. Les composés ionisés dans la source du spectromètre (par exemple par électrospray ou ionisation chimique) sont introduits dans l'analyseur de masse. L'analyseur trie ensuite les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) et les détecte pour fournir un spectre de masse caractéristique de chaque molécule (Gross, 2011).

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) utilise deux analyseurs de masse en spectrométrie. Le premier analyseur sélectionne un ion d'intérêt spécifique, appelé ion précurseur. L'ion précurseur est fragmenté dans une cellule de collision (par collision avec un gaz neutre, comme l'argon). Les fragments produits (ions fragments) sont analysés par un second analyseur de masse (Gross, 2011 ; Roboz, 2014).

Avant d'envisager l'analyse d'un échantillon, une courbe d'étalonnage de l'hormone à doser est réalisée en utilisant l'échantillon pur à différentes concentrations. Une forme deutérée de l'hormone qui fera office de standard interne (molécule dans laquelle un atome d'hydrogène a été remplacé par du deutérium) est aussi ajoutée.

La figure 15 illustre le chromatogramme obtenu par LC-MS/MS pour doser l'œstradiol et l'œstrone : l'aire sous la courbe représente la concentration du composé. De par leur mode de fonctionnement, les analyses en chromatographie combinée à la spectrométrie de masse ont une grande sensibilité et spécificité analytiques, ce qui est encore amélioré par l'utilisation de la spectrométrie en tandem (Kamrath *et al.*, 2014). Cependant, plusieurs facteurs peuvent malgré tout contribuer à l'effet matrice, notamment les modifications du pH de l'échantillon qui affectent l'ionisation de l'analyte ou la co-élution de composés avec l'analyte.

Un avantage technique des LC ou GC MS ou MS/MS est la possibilité de multiplexage. L'inconvénient majeur est le coût de l'analyse qui est plus élevé que celui des tests RIA ou ELISA pour un seul analyte. Ce surcoût s'explique par le prix de l'équipement et par la nécessité de disposer de personnel hautement spécialisé pour la mise au point et le contrôle des méthodes de quantification.

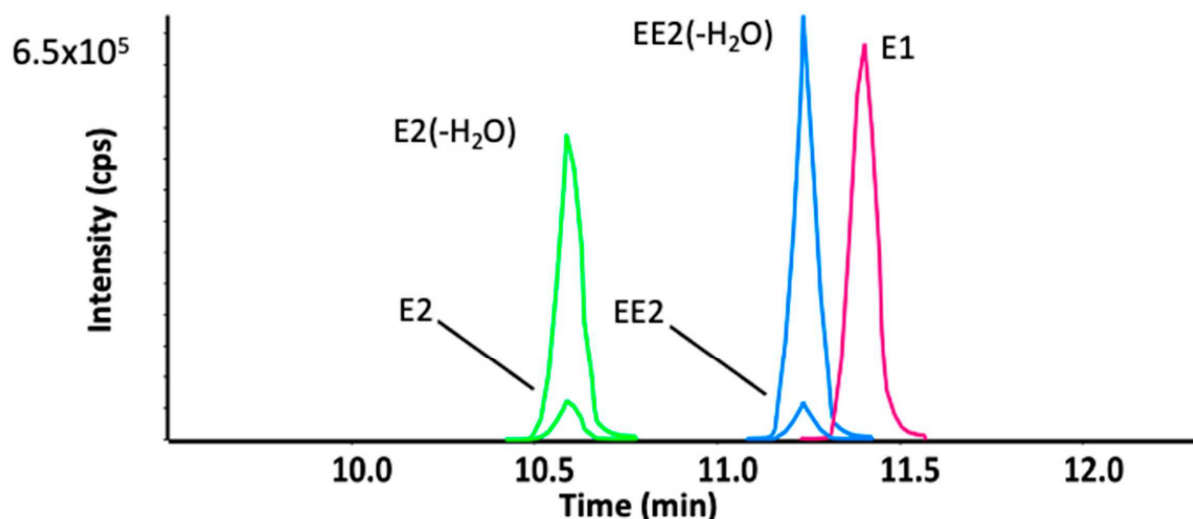


Figure 15 : Chromatogramme de l'œstrone (E1) et de l'œstradiol (E2) et de l'éthinyl œstradiol (EE2) (Chabi et Lekha, 2022). Sur le chromatogramme, l'aire sous la courbe de chaque molécule est mesurée et sur base de la courbe d'étalonnage, la concentration est calculée.

Le choix de la LC-MS/MS paraît donc particulièrement pertinent pour étudier l'évolution des concentrations des principaux stéroïdes impliqués dans la gestation du bison d'Amérique, que ce soit dans le sérum ou dans les matières fécales. En effet, cette méthode évitera les interférences avec des molécules proches que l'on pourrait retrouver dans les matrices envisagées.

Tableau VII : Avantages et inconvénients majeurs de la RIA, de l'ELISA et de la LC-MS/MS pour les dosages hormonaux.

Méthodes	Avantages	Inconvénients
RIA	▪ Sensibilité et spécificité acceptables ▪ Reproductibilité élevée ▪ Bien établi pour les hormones et biomarqueurs	▪ Un seul composé par analyse ▪ Utilisation de radio-isotopes ▪ Matériel spécialisé nécessaire ▪ Effet matrice
ELISA	▪ Sensibilité et spécificité acceptables ▪ Large disponibilité commerciale de kits ▪ Pas de radioactivité ▪ Facile à automatiser	▪ Un seul composé par analyse ▪ Difficulté de dosage pour des analytes de petite taille ▪ Effet matrice
LC-MS/MS	▪ Sensibilité et spécificité élevées ▪ Multiplexage ▪ Identification physico-chimique du composé ▪ Réduction de l'effet matrice	▪ Coûteux ▪ Temps d'analyse parfois long ▪ Complexité accrue des instruments ▪ Maintenance technique exigeante ▪ Nécessite un personnel hautement qualifié

4. Résumé de l'état actuel des connaissances de l'endocrinologie de la reproduction des bisons d'Amérique

Les données de la littérature sur l'endocrinologie de la gestation du bison d'Amérique (AmB) sont peu nombreuses et basées sur de faibles nombres d'animaux. De plus, les méthodes de dosage des stéroïdes utilisées dans la littérature des années 1900 et 2000 sont connues pour leurs sensibilité et spécificité analytiques limitées en comparaison de celles proposées par la LC-MS/MS.

Un test ELISA pour la détection de la b-PSPB à partir d'un échantillon de sang a été étudié afin de déterminer le statut de gestation chez l'AmB (Love *et al.*, 2017). Des prélèvements ont été effectués chez 49 femelles AmB à deux moments clés de la gestation, en automne et au printemps, correspondant respectivement au début et au milieu de la gestation (en moyenne 62,9 jours après l'accouplement) et au milieu et à la fin de la gestation (en moyenne 229,2 jours après l'accouplement).

Plusieurs progestagènes ont été étudiés dans différentes matrices chez l'AmB. L'oxo-pregnane (20-oxo-P), un dérivé de P4 dont la concentration est moins influencée par l'alimentation que la P4, a été dosé dans les matières fécales (MF) par ELISA pour détecter la reprise de la cyclicité (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006). Les valeurs étaient basales (inférieures à 70 ng/g de MF) pendant l'anœstrus post-partum ou saisonnier qui ont typiquement lieu jusqu'en juin ou juillet (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006). La figure 16 illustre l'évolution de la 20-oxo-P chez 9 femelles AmB gestantes.

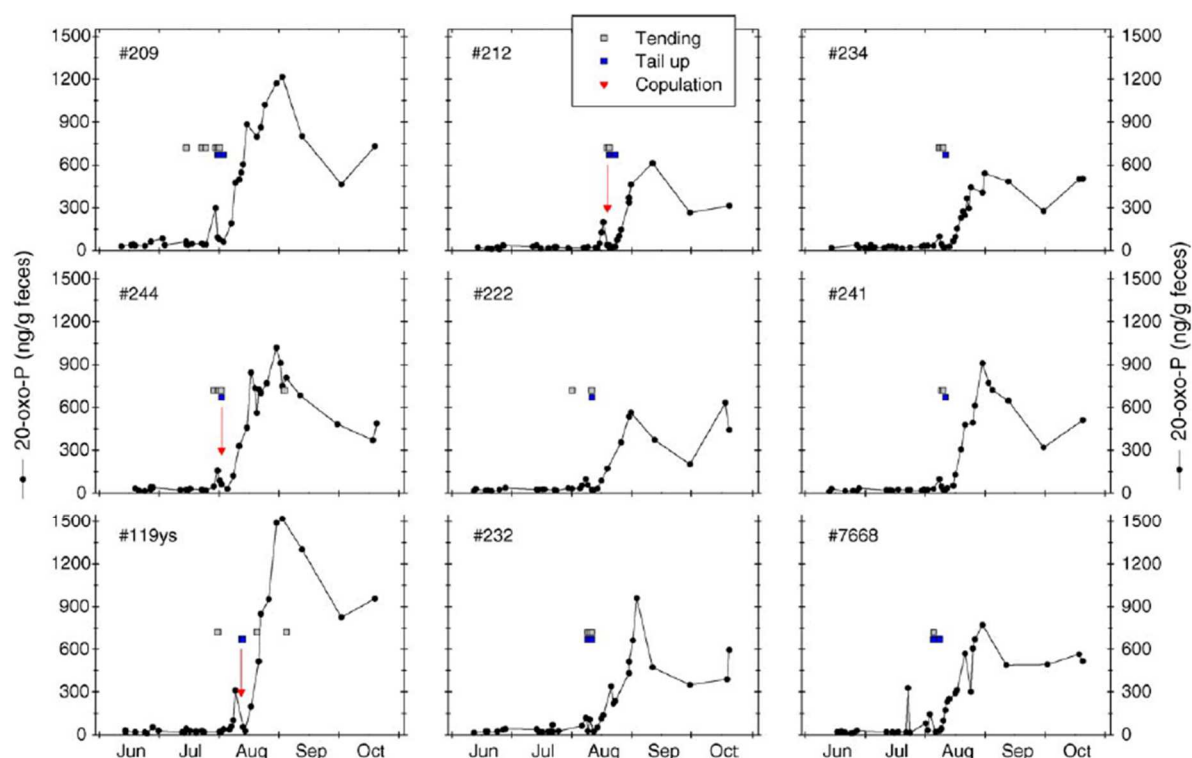


Figure 16 : Évolution de la concentration en 20-oxo-pregnane chez 9 femelles AmB gestantes depuis le mois de juin jusqu'au mois d'octobre avec identification des phases d'œstrus et de copulation (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006).

Le passage de l'anœstrus à la saison de reproduction se manifeste par une reprise de la cyclicité avec des cycles courts donnant lieu à des concentrations faibles de 20-oxo-P. Après ces cycles courts, 13 femelles ont présenté des activités lutéales avec une augmentation de la 20-oxo-P (de 100 à 300 ng/g de MF). Le prégnañdiol 3d glucoronide (PDG) a été envisagé comme marqueur urinaire de la production de P4 chez les AmB par dosage ELISA, la concentration en PDG dans l'urine étant corrélée à celle de P4 dans le sérum (Kirkpatrick *et al.*, 1991). La concentration urinaire du PDG était basse avant l'œstrus (5 à 100 ng/mg) et augmentait au moment de l'œstrus pour atteindre 350 à 1000 ng/mg en diœstrus. Durant la gestation, les concentrations minimales urinaires de PDG étaient de 54,7 ng/mg tandis qu'elles étaient inférieures à 9,9 ng/mg chez les femelles non gestantes (Kirkpatrick *et al.*, 1992).

Le tableau VIII reprend les données des auteurs ayant réalisé des études sur l'endocrinologie reproductive des bisons d'Amérique, les hormones étudiées, leurs concentrations et les méthodes de dosage.

Tableau VIII : Résumé des connaissances actuelles sur l'hormonologie du bison d'Amérique

Auteur	Année	Nombre de bisons	Milieu	Hormones	Moments du dosage	Résultats	Méthodes d'analyse
Kirkpatrick	1991	5	Urine	Pregnanediol 3d glucoronide	Œstrus et début de gestation	10,02 to 536,61 ng/mg	ELISA
			Sang	Progestérone	Œstrus et début de gestation	0,9 to 10,5 ng/ml	ELISA
Kirkpatrick	1992	18	Urine	Pregnanediol 3d glucoronide	Non gestantes	< 9.9 ng/mg	ELISA
					Gestantes	>54.7 ng/mg	
			Matières fécales	Estrogènes totaux	Non gestantes	< 0.20 ng/g	RIA
					Gestantes	>1.09 ng/g	
Kirkpatrick	1993	54	Observation oestrus	/	/	/	/
Vervaecke	2006	13	Matières fécales	20-oxo-pregnanes			ELISA
Love	2017	49	Sang	b-PSPB			ELISA

Objectifs

Des méthodes non invasives de diagnostic de gestation constituent un outil essentiel pour la gestion de la reproduction d'espèces sauvages ou peu manipulables, telles que le bison d'Amérique. L'objectif principal de ce travail était de développer un diagnostic de gestation sur une matrice facilement accessible chez le bison d'Amérique : les matières fécales. Afin de répondre à cet objectif général, le travail a été structuré en trois étapes successives.

La première étape avait pour but de quantifier les molécules d'intérêt pour un diagnostic de gestation dans le sérum de bison d'Amérique. Les PAGs ont été dosées par RIA, tandis que la P4, l'E1 et l'E1S ont été quantifiées par LC-MS/MS.

La deuxième étape avait pour objectif de développer et valider une méthode LC-MS/MS permettant le dosage de la P4 et de l'E1S dans les matières fécales, accessibles par un prélèvement non invasif. Cette phase incluait la standardisation analytique de la méthode ainsi que l'évaluation de l'homogénéité et de la stabilité des hormones dans les échantillons fécaux.

La troisième étape avait pour but d'évaluer les performances des méthodes de diagnostic de gestation mises en place durant cette étude. La pertinence du dosage hormonal par LC-MS/MS sur matières fécales comme outil de diagnostic de gestation chez le bison d'Amérique a été comparée aux dosages hormonaux sériques et aux techniques physiques classiquement utilisées chez *Bos taurus*.

Enfin, un objectif secondaire de ce travail a été de décrire la saisonnalité de la reproduction des élevages belges de bisons d'Amérique, en la comparant à celle observée dans les ranchs et parcs naturels d'Amérique du Nord. La fécondité des troupeaux belges a également été analysée et confrontée aux données disponibles chez les BT allaitantes ainsi que chez les bisons AmB ou WB vivant à l'état sauvage ou en systèmes d'élevage extensifs.

Section expérimentale

Matériels et méthodes

Les trois études présentées dans ce travail se basent sur les mêmes animaux et les mêmes techniques. Ce chapitre présente le matériel et les méthodes communs aux trois études.

1. Animaux et prélèvements

1.1 Origine des animaux

Dans les Ardennes belges, deux ranchs pratiquent l'élevage extensif de bisons d'Amérique (*Bison bison*) à partir d'individus importés du Montana (États-Unis) respectivement en 1998 et en 2004. Les animaux paissent librement dans des prairies autrefois réservées aux BT allaitants. Elles sont principalement couvertes de ray-grass, de trèfle et de fétuque. Le premier ranch est divisé en deux prairies distinctes de 19 et 21 ha. Chacune de ces prairies accueille deux mâles et respectivement 25 ou 26 femelles sexuellement matures. Le second ranch élève dix femelles vivant en liberté avec un mâle sexuellement mature dans une prairie de 15 ha. Dans les deux ranchs, les animaux ne sont pas habitués à la présence humaine ni aux manipulations, mais l'ensemble du troupeau est contrôlé chaque matin depuis un tracteur ou un quad afin de détecter des événements tels que des dystocies, des rétentions placentaires ou des avortements. En hiver, du fourrage préfané enrubanné récolté au printemps sur des pâturages similaires est distribué deux fois par jour à volonté et l'accès à l'eau est permanent et vérifié quotidiennement.

1.2 Calcul du jour de gestation au moment du prélèvement

Le jour de fécondation des femelles AmB ayant vêlé a été rétrospectivement estimé en soustrayant 276 jours de la date de vêlage (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006). Le jour de gestation au moment du prélèvement a ensuite été déterminé en soustrayant le jour de fécondation de celui de prélèvement.

1.3 Critères d'exclusion et d'inclusion dans les groupes

Sur l'année 2019, 36 femelles et un taureau ont été prélevés. Sur l'année 2020, 56 femelles et six taureaux ont été prélevés. Sur un total de 99 prélèvements, sept sont issus de taureaux et 92 de femelles. Au total, 15 femelles sur les 92 ont été exclues de l'étude : quatre ont été réformées avant la mise-bas, cinq ont avorté, et 6 ont vêlé dans l'année, mais plus de 293 jours après la date de prélèvements, ces femelles étant donc considérées comme non gestantes au moment des prélèvements. Aucun mâle n'a été exclu des études (*figure 17*).

Vingt-quatre femelles ont été prélevées en 2019 et en 2020. Parmi celles-ci, 11 ont été exclues. Au final, après les exclusions, la population est composée de 84 animaux. Ceux-ci ont été divisés en cinq classes : taureaux, utilisés comme témoins négatifs (B ; n=7) ; femelles non gestantes, lorsqu'aucun vêlage n'a été observé dans les 276 jours suivant l'échantillonnage (NP ; n=32) ; femelles au premier trimestre de gestation (1TP ; n=3), du jour un au jour 92 ; femelles au deuxième trimestre de gestation (2TP ; n =27), du jour 93 au jour 183 ; femelles au troisième trimestre de gestation (3TP ; n= 15), du jour 184 à la mise-bas (*figure 17*).

1.4 Moment et méthodes de prélèvement

Une fois par an, les animaux sont rassemblés et immobilisés dans un système de contention spécifique pour le dépistage obligatoire des maladies infectieuses comme l'IBR et tous les actes de prophylaxie. Entre janvier et février 2019, puis entre février et mars 2020, cette opportunité a été utilisée pour prélever par ponction veineuse, au niveau de la veine coccygienne, du sang dans des tubes secs chez tous les bisons d'Amérique adultes. Les échantillons sériques ont été centrifugés (1000 x g) et conservés congelés (-80 °C) jusqu'aux analyses. Des matières fécales ($\pm$ 50 mL) ont été prélevées au niveau de l'ampoule rectale et congelées (-20 °C) dans les six heures suivant le prélèvement puis conservées jusqu'aux analyses. Les prélèvements sanguins ont été utilisés pour les analyses de la première étude tandis que les prélèvements de matières fécales ont été utilisés pour les deuxième et troisième études. La troisième étude compare les dosages dans les matières fécales avec les dosages sériques et la palpation transrectale et échographie (TRPUS) (*figure 17*).

En 2022, quatre fèces entières et non mélangées provenant de deux femelles gestantes, une non gestante et un mâle ont été collectées dans les 15 minutes après leur émission, identifiées puis conservées entières et congelées (-20°C) dans les trois heures, jusqu'à leur analyse, pour tester leur homogénéité. Ces 4 prélèvements ont été utilisés pour la deuxième étude de la thèse.

1.4.1 Palpation transrectale et échographie (TRPUS)

Trois opérateurs expérimentés en reproduction des ruminants ont réalisé une palpation et une échographie transrectales (TRPUS) à l'aide d'un échographe EBmax RKU10 équipé d'une sonde transrectale multifréquence de 6 à 9,5 MHz (Echomedic, Lahamaide, Belgique) sur les femelles prélevées. La procédure durait trois minutes au total, mais pouvait être raccourcie si l'animal devenait violent. Un diagnostic positif de gestation était établi lorsque l'utérus était dilaté à la palpation ou que des cotylédons ou des parties du fœtus étaient observés à l'échographie. Si l'utérus était petit et qu'il n'y avait pas de cotylédons ou de liquide dans la lumière utérine, la femelle était considérée comme non gestante. En cas d'informations discordantes après trois minutes ou lorsque l'animal devenait violent, le diagnostic de gestation par TRPUS était considéré comme non concluant.

L'inclusion et l'exclusion des animaux, l'ensemble des prélèvements ainsi que les analyses réalisées et leur nombre sont résumés dans la figure 17 qui présente aussi le calcul rétrospectif du jour de gestation au moment des prélèvements.

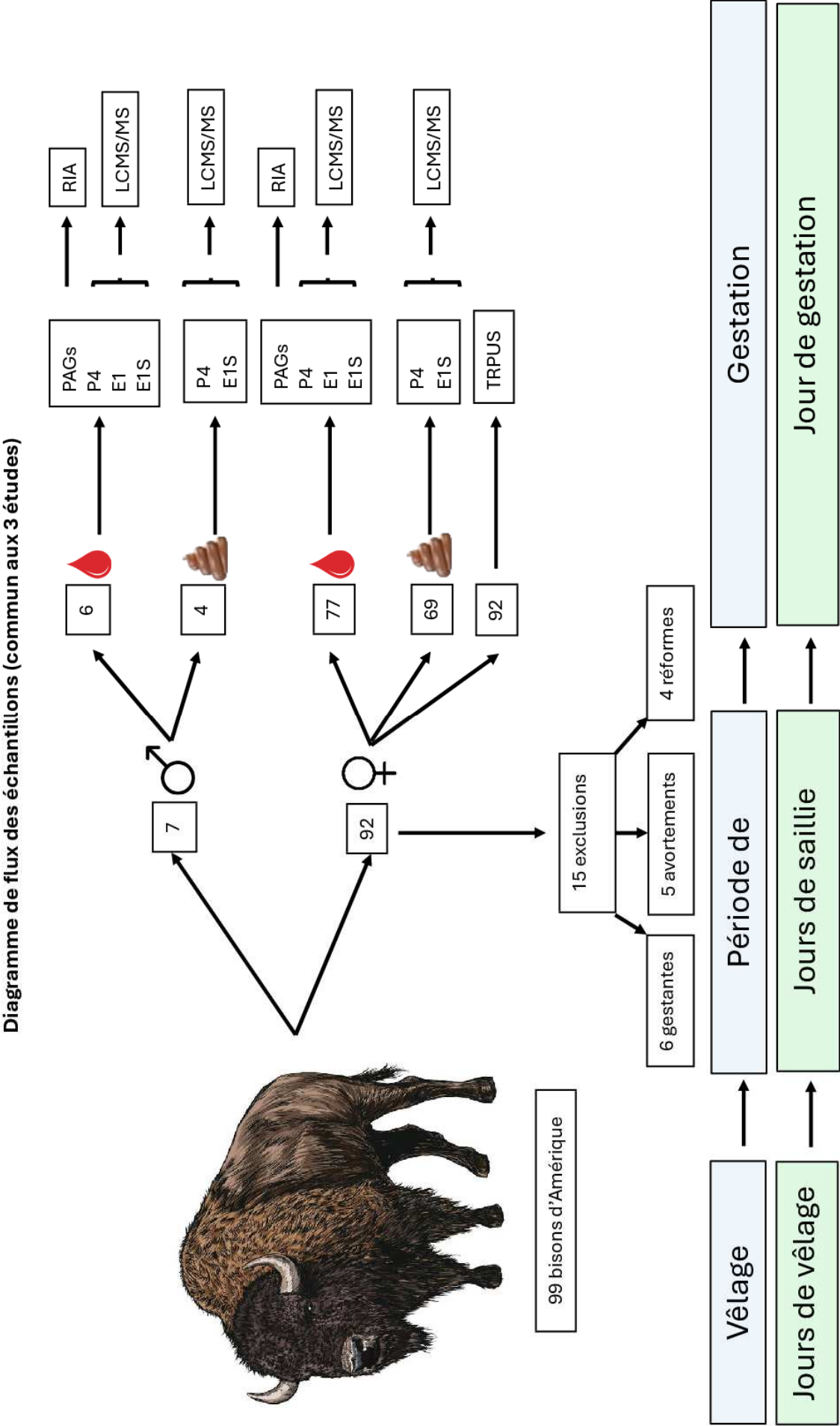


Figure 17 : Nombre d'animaux prélevés en 2019 et 2020, nombre d'analyses réalisées sur le sérum et les matières fécales et technique de dosage. PAGs = glycoprotéines associées à la gestation ; P4 = progestérone ; E1 = œstrogène ; E1S = sulfate d'œstrogène ; TRPUS = palpation transectale et échographie ; RIA = radio-immuno assay ; LC-MS/MS = chromatographie liquide couplée à une double spectrométrie de masse. Le calcul du jour de gestation est réalisé rétrospectivement à partir de la date de vêlage en soustrayant 276 jours de gestation, ce qui donne le jour de saillie.

1.4.2 Dosages des hormones dans le sérum et dans les matières fécales

1.4.2.1 Dosages des PAGs dans le sérum par RIA

Le dosage des PAGs a été réalisé sur des vaches Amb gestantes, non gestantes et des mâles Amb ; ces deux derniers groupes ont servi de témoins négatifs. Le dosage RIA-706 caprin, développé selon la méthode de Perenyi *et al.* (2002) décrite précédemment, a été utilisé pour mesurer les concentrations de PAGs : une étude préliminaire avait démontré qu'il permettait la meilleure détection des épitopes de PAGs échantillonnés chez des espèces dont les PAGs sont étroitement apparentées, telles que les PAGs AmB 84916, 84917 et 84918 (Kiewisz *et al.*, 2008). Tous les dosages ont été effectués dans un tampon Tris-HCl (ajusté à pH 7,6) contenant 0,1 % de *Bovine Serum Albumin* (BSA) (fraction V ; Sigma-Aldrich Co., Saint-Louis, Missouri, États-Unis). Les mesures ont été réalisées en duplicate dans des tubes en polystyrène et les incubations ont été effectuées à température ambiante (20 à 22 °C). Une préparation de PAG bovine de 67 kDa (boPAG67kDa, numéro d'accès Q29432 dans l'EMBL-EBI database ; UniProt KB) a été utilisée comme étalon et traceur pour tous les dosages. La solution mère de boPAG67kDa (poudre lyophilisée) a été diluée dans un tampon d'essai pour obtenir des courbes d'étalonnage allant de 0,2 à 25 ng/mL (système pré-incubé) ou de 0,8 à 100 ng/mL (système non pré-incubé). L'iodation (Na-I^{125} , Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) a été réalisée selon la méthode à la chloramine T décrite précédemment (Greenwood *et al.*, 1963). Le système de précipitation à double anticorps était composé d'un mélange d'immunoglobulines anti-lapin de mouton (0,83 % v/v), de sérum de lapin (0,17 % v/v), de polyéthylène glycol 6000 (20 mg/mL ; Fluka Biochemika, Buchs, Suisse), de cellulose microcristalline (0,05 mg/mL ; Merck, Darmstadt, Allemagne) et de BSA (2 mg/mL) diluée dans un tampon Tris (25 mM Tris, 10 mM MgCl_2 et 0,02 % p/v NaN_3 ; pH 7,5).

Les échantillons de sérum ont d'abord été analysés dans un système pré-incubé avec une courbe standard de 0,2 à 25 ng/mL. Les échantillons présentant des concentrations de PAGs supérieures à la dose standard, pour laquelle le pourcentage B/B0 était de 20 %, ont été ré-analysés dans des systèmes non pré-incubés, avec une courbe standard de 0,8 à 100 ng/mL. Les échantillons de standard et de plasma (0,1 mL) ont été dilués respectivement dans 0,1 mL et 0,2 mL de tampon Tris-BSA. Du sérum de AmB (sérum sans PAG ; 0,1 mL) a été ajouté à chaque tube de la courbe standard. La liaison maximale (B0) a été déterminée en remplaçant les préparations de standards par 0,1 mL de tampon d'analyse. Les tubes de liaison non spécifique contenaient 0,3 mL de tampon et 0,1 mL de sérum sans PAG. Après l'ajout d'une dilution appropriée d'antisérum (AS#706 à 1 :100.000 ; 0,1 mL), les échantillons de sérum et

les tubes standards ont été incubés une nuit à température ambiante (20 à 22 °C) (système pré-incubé). Le lendemain (ou directement sans préincubation d'une nuit dans le système non pré-incubé), 0,1 ml de traceur (25 000 cpm) a été ajouté à tous les tubes, et ces derniers ont été incubés pendant 4 h à température ambiante.

La séparation des fractions libres et liées a été réalisée par centrifugation (20 min à 1 500 g, 10°C). Après incubation des tubes pendant 30 minutes avec la solution de PEG contenant le second anticorps, 2 ml de tampon Tris ont été ajoutés et les tubes ont été centrifugés (20 min à 1500 g). Le surnageant a été aspiré et 4 ml de tampon Tris ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont été centrifugés (20 min à 1500 g) et le surnageant aspiré. L'iode 125 présent dans le culot a été quantifié à l'aide d'un compteur gamma (Packard Cobra II AutoGamma, Milan, Italie). Les résultats sont exprimés en pourcentage du rapport entre les quantités de traceur liées à l'anticorps en présence (B) et en absence (B0) de PAG non marqué. La limite de détection minimale (LDM), calculée comme la concentration moyenne plus deux fois l'écart-type de 20 duplicatas de l'étalon zéro (B0) (Skelley *et al.*, 1973), était de 0,1 ng/ml. Les coefficients de variation intra- et inter-essais étaient respectivement de 2,9 % et 7,3 %.

1.4.2.2 Dosage de la progestérone, de l'œstrone et du sulfate d'œstrone dans le sérum

Les stéroïdes ont été dosés par LC-MS/MS, en utilisant une méthode précédemment validée (Dufour *et al.*, 2021), à l'aide d'un Shimadzu Nexera X2 LC-30AD (Shimadzu Co., Kyoto, Japon) équipé d'une colonne BEH C18 (2,1 mm × 100 mm, granulométrie de 1,7 µm ; Acquity UPLC, Waters). Cent microlitres d'échantillon de sérum animal ont été enrichis avec 10 microlitres de mélange d'étalons internes (d4-E3S à 500 ng/mL, d9-PRO à 100 ng/mL, 13C3-E1 et d5-E2 à 2 ng/mL). Le système HPLC était connecté à une combinaison linéaire d'un triple quadripôle et d'un analyseur de masse IonTrap, le QTrap 6500 (ABSciex, Framingham, Massachusetts, États-Unis), fonctionnant en mode triple quadripôle. Analyst 1.6.2 (AB SCIEX, Singapore) a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. Pour la P4, l'E1 et l'E1S, la LLOQ, définie comme la concentration la plus faible dans les normes de validation rapportant un écart type relatif et un biais relatif inférieurs à 15 % (Dufour *et al.*, 2021), a été établie respectivement à 0,1 ng/mL, 2,0 pg/mL et 0,5 ng/mL.

1.4.2.3 Dosage de la progestérone et du sulfate d'œstrone dans les matières fécales

Cinq cents milligrammes (± 50 mg) d'échantillon d'étalon, de contrôle qualité ou de matières fécales de bison d'Amérique ont été enrichis avec dix microlitres de standard interne (d4-E1S à 10 ng/mL et d9-P4 à 400 ng/mL) avant extraction. Deux millilitres de méthanol étaient ajoutés aux matières fécales enrichies, le mélange était agité au vortex pendant 10 secondes, puis soniqué (Sonorex Type RK510, Bandelin, Berlin, Allemagne) pendant 15 minutes. Le mélange était ensuite centrifugé ($1000 \times g$ pendant cinq minutes), puis le surnageant était recueilli et transféré dans un tube en verre. L'extraction au méthanol était répétée une fois et les fractions méthanoliques étaient recueillies. L'extrait méthanolique était lavé avec 3 mL d'hexane, puis évaporé à sec sous vide à 40 °C pendant une nuit. L'extrait sec était ensuite resolubilisé dans 100 μ L d'un mélange eau/acétonitrile (80/20) et transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL. Le mélange était centrifugé à $16.100 \times g$ pendant 10 min et le surnageant était transféré dans des flacons LC avant introduction dans le dispositif LC-MS/MS.

L'efficacité d'extraction indique le pourcentage d'hormone extraite de la matrice. Elle est calculée par le rapport entre la surface mesurée après extraction et la surface déterminée dans les échantillons enrichis après extraction sur le chromatogramme. L'efficacité d'extraction et les effets matrice ont été évalués à deux niveaux (faible : 50 pg/g pour E1S et 10 ng/g pour P4 ; élevé : 500 pg/g pour E1S et 100 ng/g pour P4), chaque niveau étant évalué en triple. Les effets matrice (%) ont été déterminés par la différence entre le rapport de la surface mesurée pour les composés et la surface déterminée pour le standard interne correspondant dans un étalon enrichi après extraction et le même rapport pour les étalons purs. Les LLOQ et *higher limit of quantification* (HLOQ) ont été définies comme les concentrations les plus faibles et les plus élevées, respectivement, dans les étalons de validation présentant une déviation standard relative (RSD) et un biais relatif (RB) inférieurs à 15 %. Pour la P4 et l'E1S, la LLOQ, définie comme la concentration la plus faible dans les normes de validation rapportant un écart type relatif et un biais relatif inférieurs à 15 % (Dufour *et al.*, 2021), a été établie respectivement à 4 ng/g, et 20 pg/g.

Afin d'évaluer l'homogénéité des échantillons fécaux, les hormones stéroïdes ont été dosées dans des fractions d'échantillons prélevés aux quatre quadrants de chaque échantillon. Afin d'évaluer la stabilité des stéroïdes dans les matières fécales, la partie restante des échantillons de matières fécales a été homogénéisée et un échantillon a été laissé à température ambiante (15-25°C) pendant 24 heures et un autre pendant 96 heures avant d'être analysés.

2. Statistiques

Graphpad Prism a été utilisé (version 9.0 pour Mac OS X, Graphpad Inc., San Diego, États-Unis) pour la majorité des analyses statistiques, sauf pour la validation de la méthode LC-MS/MS dans les matières fécales. La significativité statistique a été établie à $p < 0,05$ pour cette étude prospective en double aveugle. La distribution normale des valeurs a été testée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne $\pm$ écart type (SD).

Comme un seul échantillon de sérum était disponible par an et par animal, une ANOVA pour mesures non répétées a été réalisée pour déterminer les différences de concentrations entre les groupes B, NP, 1TP, 2TP et 3TP pour chaque hormone dosée dans le sérum, avec un post-test de Turkey. Le test de Pearson a été utilisé pour déterminer les corrélations entre les concentrations d'hormones ou entre les concentrations d'hormones et le jour de la gestation.

Dans le cadre de la validation de la méthode LC-MS/MS dans les matières fécales, le logiciel R Studio a été utilisé (version 3.4.1 ; R Project for Statistical Computing). La distribution normale des valeurs a été testée par le test de Shapiro-Wilk. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé pour déterminer les corrélations entre les concentrations sériques et fécales d'hormones. Pour l'E1S, la corrélation a été testée uniquement sur la cohorte de femelles gestantes, car les concentrations dans le sérum et les matières fécales étaient inférieures à la LLOQ chez les mâles et les femelles non gestantes. La corrélation entre les dosages de P4 ou d'E1S dans les matières fécales et le jour de la gestation a été testée à l'aide du test non paramétrique de Spearman.

Les performances des différentes méthodes de diagnostic de gestation envisagées au cours des études ont ensuite été déterminées en n'incluant que les animaux NP, 2TP et 3TP, le groupe 1TP étant trop petit pour pouvoir être utilisé. Pour le TRPUS, le test exact de Fisher a servi à déterminer la significativité de la distribution du tableau de contingence, puis la sensibilité (Se), la spécificité (Sp) et le Likelihood Ratio (LR) ont été déterminés. Les diagnostics de gestation incertains ont également été étudiés de cette manière, en posant comme hypothèse nulle la même probabilité qu'un TRPUS non concluant conduise à un diagnostic de gestation positif ou négatif. Le test de Leven ayant montré des différences entre les variances observées dans les groupes de femelles gestantes (P) et non gestantes (NP) pour tous les dosages hormonaux, un test de t corrigé de Welch a été utilisé. Des *Receiver Operating Curves* (ROCs) ont ensuite été réalisées afin de déterminer le meilleur seuil permettant de distinguer les animaux P et NP pour chaque hormone dosée dans le sérum ou les matières fécales (Ponthier *et al.*, 2010 ; Dettleux *et al.*, 1999). Pour chaque analyse ROC,

le test de Fisher a été utilisé pour déterminer la significativité du tableau de contingence et les valeurs suivantes : Se, Sp, Valeur Prédictive Positive (VPP), Valeur Prédictive Négative (VPN) et LR. Pour les dosages sériques de P4 et E1S, un modèle combiné a été créé afin de déterminer les seuils de ces deux hormones pour obtenir les meilleures Se et Sp. Pour diagnostiquer le trimestre de gestation, un test de t corrigé par Welch a été réalisé sur les données log-normalisées de 2TP et 3TP pour les concentrations d'E1 et E1S dans le sérum et de P4 et E1S dans les matières fécales. La procédure ROC a ensuite été utilisée pour déterminer le meilleur seuil permettant de distinguer 2TP et 3TP en utilisant le LR.

Le test Khi-2 a été utilisé pour déterminer si la distribution des vêlages différait entre les mois. Le taux de mise-bas a été calculé comme le nombre de femelles de plus de 24 mois donnant naissance à un veau vivant au cours de l'année, divisé par le nombre total de femelles matures, à l'exclusion des femelles réformées. Ce rapport a été exprimé en pourcentage afin d'être comparable aux données décrites par les élevages de bisons en Amérique du Nord ainsi que dans les parcs pour lesquels des données sont disponibles.

Section expérimentale

Etude 1 :

**American Bison (*Bison bison*) reproductive endocrinology: serum
Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG), Progesterone, Estrone and
Estrone-Sulfate in non-pregnant animals and during gestation**

<i>Domestic Animal Endocrinology 78 (22) 106684</i>

Vincent FRISEE, Goulven RIGAUX, Patrice DUFOUR, Olimpia BARBATO, Flore
BRUTINEL, Sophie EGYPTIEN, Philippe BOSSAERT, Stéfan DELEUZE, Etienne
CAVALIER, Jérôme PONTIER

Préambule

Les glycoprotéines associées à la gestation, la progestérone, l'œstrone et le sulfate d'œstrone sont des marqueurs souvent utilisés dans le cadre du diagnostic de gestation chez *Bos taurus* ou d'autres ruminants. Cependant, les données de littérature à ce sujet étaient rares chez l'AmB et ne comportaient que de petits groupes d'animaux (entre cinq et 49 animaux) et durant des périodes très limitées de la gestation, en règle générale le premier trimestre (Kirkpatrick *et al.*, 1991 ; Kirkpatrick *et al.*, 1992 ; Love *et al.*, 2017 ; Vervaecke et Schwarzenberger, 2006). De plus, la variété des méthodes de dosage utilisées dans ces études antérieures entraînait des variations assez importantes dans les concentrations décrites (Koren *et al.*, 2012 ; Zongliang *et al.*, 2018). La description des profils endocriniens sériques apparaissait donc comme un prérequis utile au développement d'un diagnostic de gestation chez le bison d'Amérique. Le rassemblement des troupeaux pour leur suivi sanitaire annuel a permis d'obtenir des échantillons sériques de bisons Américains femelles non gestantes et gestantes, ainsi que de mâles. Les profils sériques obtenus sont des points de référence pour le développement ultérieur d'un diagnostic de gestation.

Dans deux ranchs, des bisons d'Amérique adultes ont été échantillonnés une fois par an pendant deux ans. Les dates de vêlage des femelles bisons d'Amérique ont été consignées à la fin de chaque année pour permettre d'estimer la date de saillie. Les concentrations sériques de PAGs ont été déterminées par RIA (Kiewisz *et al.*, 2008), tandis que les concentrations en P4, E1 et E1S ont été dosées par LC-MS/MS (Dufour *et al.*, 2021). Sept taureaux bisons d'Amérique et 92 vaches ont été échantillonnés. Les concentrations sériques de ces 4 marqueurs ont été comparées entre les taureaux bisons d'Amérique (B, n = 7), les vaches non gestantes (NP, n = 32), et les vaches en premier (1TP, n = 3), deuxième (2TP, n = 27) et troisième (3TP, n = 15) trimestre de gestation. Les PAGs et la P4 étaient plus élevées dans les groupes 2TP et 3TP que dans les groupes B et NP ($p < 0,0001$). La P4 était non basale dans les groupes B et NP. L'E1 et l'E1S étaient corrélées ($p < 0,0001$; $r = 0,76$) et augmentées dans les groupes 2TP et 3TP par rapport à B et NP ($p < 0,01$). De plus, l'E1S était plus élevée dans le groupe 3TP que dans le groupe 2TP ($p < 0,0001$) et corrélée au jour de gestation ($p < 0,0001$; $r = 0,60$).

Sur les 92 femelles, 51 ont vêlé au cours de ces deux années. Étant donné que le jour de gestation lors du prélèvement est calculé sur base de la date de mise-bas, les informations recueillies ont permis d'avoir un aperçu de la saisonnalité des mises-bas dans les élevages d'AmB en Belgique. Les vêlages ont eu lieu principalement au printemps (74,5 %), mais aussi en été (13,7 %) et en automne (11,8 %).



Contents lists available at ScienceDirect

Domestic Animal Endocrinology

journal homepage: www.journals.elsevier.com/domestic-animal-endocrinology

American Bison (*Bison bison*) reproductive endocrinology: serum Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG), Progesterone, Estrone and Estrone-Sulfate in non pregnant animals and during gestation



V. Frisée^{a,#}, G. Rigaux^{b,#}, P. Dufour^c, O. Barbato^d, F. Brutinel^e, S. Egyptien^e, P. Bossaert^a, S. Deleuze^e, E. Cavalier^c, J. Ponthier^{e,*}

^a Production animals Department, Liège University, Liège, Belgium

^b Pan Anima, Tournai, Belgium

^c Clinical Chemistry, University Hospital (CHU), Liège University, Liège, Belgium

^d Veterinary Medicine Department, Perugia University, Perugia, Italy

^e Theriogenology, Liège University, Liège, Belgium

Abstract

This study describes concentrations of Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG), progesterone (P4), estrone (E1) and estrone-sulfate (E1S) in American Bison sera.

In 2 ranches, mature American Bison were sampled once a year for 2 years. Subsequent American Bison cows calving days were reported. PAG concentration was determined by Radio-Immuno Assay, whereas P4, E1 and E1S were assayed using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. Concentrations were compared between American Bison bulls (B, n=7), Non-Pregnant cows (NP, n=32), first (1TP, n=3), second (2TP, n=26) and third (3TP, n=15) trimester of pregnancy.

Seven American Bison bulls and 92 cows were sampled, 51 calved during these 2 years. Calving occurred mostly in spring (74.5%), but also in summer (13.7%) and fall (11.8%). PAG and P4 were higher in 2TP and 3TP than B and NP ($p<0.0001$). P4 was non-basal in B and NP. E1 and E1S were correlated ($p<0.0001$; $r=0.76$) and increased in 2TP and 3TP when compared with B and NP ($p<0.01$). Moreover, E1S was higher in 3TP than in 2TP ($p<0.0001$) and correlated to pregnancy day ($p<0.0001$; $r=0.60$).

Breeding American Bison in Belgium induces a calving seasonality loss. P4 slowly increases in 1TP and remains steady and high in 2 and 3TP. P4 non-basal and variable concentrations in B or NP disable its use as gestation marker. American Bison produce PAG in the 2 and 3TP, but Estrone-sulfate assay seems to be the best pregnancy marker during the 2 last trimesters as it could help to estimate the gestation period.

1. Introduction

Although they were recently nearly extinct, American Bison (*Bison bison bison* or *Bison bison athabasca*) are re-invading their natural environment and bred in natural parks or for meat production. Due to American Bison wild character [1] and its extensive breeding management, reproductive endocrinology of non-pregnant and pregnant animals is poorly described. Bison estrus cycle has been estimated to be around 21 days [2, 3]. They exhibit 5-6 cycles [2] during the ovulatory season in autumn [4], whereas an anestrus is observed during the other periods of the year [4]. In a natural environment, American Bison calving season is spring (May to July) after around 275 days of gestation [5, 6], although weather or grazing areas and nutrition could modulate this duration [6]. The endocrinology of American Bison and bovine gestations seems to share common features, such as Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) [6, 7] and estrogens [5, 8] production.

Radio Immuno Assay (RIA) or Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for PAG have been validated in American Bison placental extracts [7, 9-11]. These assays are suitable in serum, but their evolution of concentrations during pregnancy is still unknown. Semi-quantitative BIO-PRYN ELISA for Pregnancy-Specific Protein-B (PSPB) [12], one of the glycoproteins of the PAG family [13], has recently been described for pregnancy diagnosis in American Bison, but the evolution of PSPB concentration was not precisely reported during pregnancy [6].

Urinary and fecal sexual steroids have been assayed in early studies on small numbers of 3-months pregnant American Bison cows [3, 5], but the type of estrogens and their blood concentrations were not reported [5]. Moreover, most of these studies used steroids dedicated immuno-assays [5]: they were not necessarily validated for this species' biological matrix, and this can lead to variations in the observed steroids concentrations [14, 15]. The use of Liquid Chromatography and Electrospray Tandem Mass Spectrometry (LC-MS), has recently been described by our team for specific steroids assays in different species [15] and could decrease intrinsic results' variations.

As reproductive endocrinology of American Bison still requires investigations, this report aims to describe PAG, progesterone (P4), estrone (E1) and estrone-sulfate (E1S) in American Bison bulls, non-pregnant cows and during their pregnancies using a large number of animals sampled. The zootechnical results of ranches extensively breeding American Bison (*Bison bison*) in Belgium are also presented.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and sampling

In the Belgian Ardennes ($\pm 50^\circ\text{N}$), 2 ranches are extensively breeding wild American Bison (*Bison bison*) imported from Montana (USA) since 1998 and 2004, respectively. Animals are freely grazing in meadows previously dedicated to beef cattle, that are mainly covered by ray grass, clover and fescue. During the winter, wrapped hay collected on similar pastures during the spring is given twice a day, ad libitum. The first ranch herd is divided in 2 separate meadows of 19 and 21ha, each welcoming 2 sexually mature American Bison bulls and respectively 25 or 26 sexually mature cows. In the second ranch, 10 sexually mature American Bison cows are roaming freely with 1 sexually mature bull in a 15ha meadow. In both ranches, American Bison are not used to human presence and to manipulations. Once a year, animals are gathered and immobilized for mandatory diseases screening in a specific handling/chute system. Between January and February 2019, and between February and March 2020, this opportunity was used to collect blood in 2 dry tubes by venipuncture under the tail of all matures American Bison. Blood samples were centrifuged ($1000 \times g$) and stored frozen (-80°C) until assays.

Among the 5 American Bison bulls, 2 were sampled in 2019 and 2020. Of the 92 samples collected on American Bison cows, 52 were obtained from the same animal sampled in 2019 and 2020. Calving days of the American Bison cows were recorded for the year following the sampling procedures. Fertilization day of American Bison cows that calved was retrospectively obtained by subtracting 276 days of the calving day. Gestation day on blood sampling day was then determined by subtracting the fertilization day of the sampling day. Other events, such as abortion, disease, culling or late birth (more than 276 days after sampling) were reported by the breeders during the following year.

2.2. PAG assays in serum

Assays for PAG were performed on pregnant, non-pregnant cows and males: the last two groups were used as negative control. The caprine RIA-706 assay developed with the previously described method [16] was used to measure PAG concentrations, as a preliminary study showed it was allowing the best detection of PAG epitopes sampled in closely related species, as bovine or American Bison. Pure boPAG 67kDa preparation was used as standard and tracer. Iodination (Na-I^{125} , Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) was carried out according to the Chloramine T method previously described [17]. Shortly, the samples were first assayed in a preincubated system with standard curve ranging from 0.2 to 25ng/mL. Samples with PAG concentrations above the estimated standard dose of 25ng/mL at which the percentage B/B0 was 20% (ED20) were re-assayed in non-preincubated systems, with a

standard curve ranging from 0.8 to 100ng/mL after an overnight incubation. The minimum detection limit (MDL), calculated as the mean concentration plus twice the standard deviation of 20 duplicates of the zero (B0) standard [18], was 0.1ng/mL. The intra- and inter-assay coefficients were 2.9% and 7.3%, respectively.

2.3. Progesterone (P4), Estrone (E1) and Estrone-Sulfate (E1S) assays in serum

Steroids were assayed using the Liquid Chromatography and Electrospray Tandem Mass Spectrometry (LC-MS) technique previously validated [15] using a Shimadzu Nexera X2 LC-30AD (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) equipped with a BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm particle size; Acquity UPLC, Waters). The HPLC system was connected to a linear combination of triple quadrupole and Orbitrap mass analyzer, QTrap 6500 (ABSciex, Framingham, Massachusetts, USA) operating in triple-quadrupole mode. Analyst 1.6.2 was used for data acquisition and processing. For P4, E1 and E1S, Lower Limit of Quantification (LLOQ), defined as the lowest concentration in the validation standards that reported Relative Standard Deviation and Relative Bias lower than 15% [15], were established at respectively 0.1ng/mL, 2.0pg/mL and 0.5ng/mL.

2.4. Statistics

Graphpad Prism was used (version 9.0 for Mac OSX, Graphpad Inc., San Diego, USA) and statistical significance was established at $p < 0.05$ for this double-blind prospective study. Normal distribution of values was tested with *Kolmogorov-Smirnov test*. Results are expressed as mean ± standard deviation.

Fertility was calculated as the number of mature American Bison cows giving birth to a live calf within the year divided by the total number of mature American Bison cows, excluding the culled females. As their gestation day at the time of sampling could not be retrospectively determined by calculations, aborted and culled animals were excluded for the calving seasonality assessment and the hormonal curves establishments. *Khi-2 test* was used to determine if the distribution of calving differed between months. American Bison samples were divided into 5 classes: Bulls, used as negative controls (B); Non-Pregnant, when no calving was observed within the next 276 days after sampling (NP); 1st trimester of pregnancy (1TP), from day 1 to day 92; 2nd trimester of pregnancy (2TP), from day 93 to day 183; 3rd trimester of pregnancy (3TP), from day 184 to the end. As only one sample was available per year and per animal, an ANOVA for non-repeated measures was performed to determine differences in concentration between groups for each hormone assayed, with a *Tukey post-test*. *Pearson test* was used to determine correlations between hormones concentrations or between hormones concentrations and pregnancy day.

3. Results

3.1. Breeding results and seasonality

During the 2-years study, 99 matures American Bison serum samples were collected and 7 of them were originating from American Bison bulls. Among the 92 females' samples, 32 were originating from non-pregnant animals. Four females were culled within the following year and five American Bison cows (5.7%) aborted some weeks after sampling procedures, without causal relationship. Sampled American Bison cows gave births to 51 calves: 59.0% of Bison cows produced a calf per year in the first ranch and 50.0% in the second. No twin pregnancy was observed during our study. Table 1 shows the monthly pattern of calving during the 2-years study: in studied Belgian ranches, American Bison births were mostly observed in spring (74.5%), but also in summer (13.7%) and early fall (11.8%). As sampling occurred in January and February 2019 and in February and March 2020, pregnant animals' samples were mostly collected in 2 and 3TP (respectively: n=26 and n=15), whereas only 3 samples were collected in 1TP. Body score evaluation using bovine standards [19], was evaluated at 5 for the first ranch herd and 3 for the second.

Table 1: Monthly distribution (%) of calving observed in 2019 and 2020

Winter			Spring			Summer			Fall		
January	February	March	April	May	June	July	August	Septemb	October	Novemb	Decemb
0	0	0	37.3 *	25.5 *	11.8	7.8	2.0	3.9	3.9	7.8	0

Births are expressed in percent (%). () expresses a significantly increased number of calving when compared to a monthly equivalent repartition of calving.*

3.2. Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) evolution during Bison pregnancy

Nearly basal PAG concentrations did not differ ($p>0.05$) between B ($0.21\pm0.12\text{ng/mL}$) and NP ($0.25\pm0.62\text{ng/mL}$), that were used as negative controls. PAG concentrations in the 3 samples of 1TP American Bison cows were also basal (day 25= 0.1ng/mL ; day 56= 0.2ng/mL ; day 63= 0.1ng/mL) and similar to those observed in B and NP. PAG significantly increased ($p<0.0001$) in 2 and 3TP, when compared to B and NP groups. However, PAG concentrations did not differ ($p>0.05$) between 2 and 3TP and standard variation was very large in those 2 periods (respectively $16.00\pm6.42\text{ng/mL}$ and $20.14\pm8.99\text{ng/mL}$). The evolution of PAG during pregnancy is summarized in Figure 1.

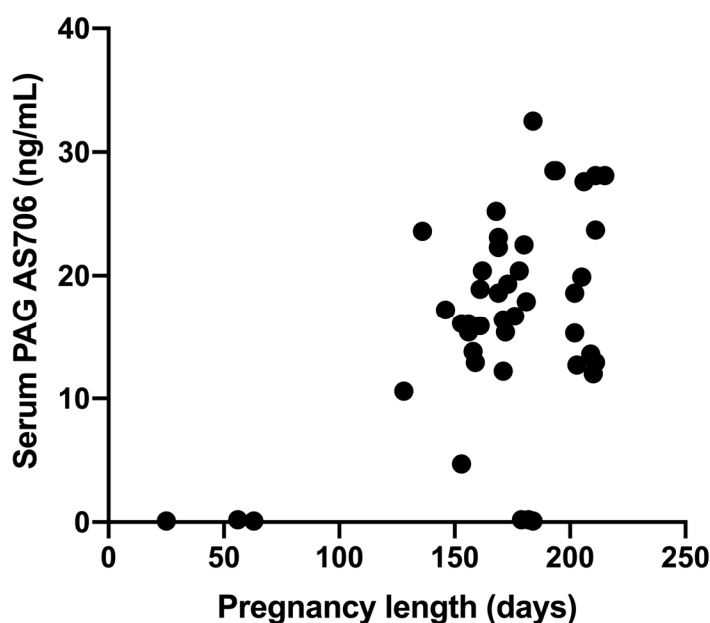


Figure 1: Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) concentration assayed with AS706 antibodies in ng/mL evolution during American Bison pregnancy (in days)

3.3. Progesterone (P4) evolution during bison pregnancy

Progesterone concentrations did not differ ($p>0.05$) between B and NP and showed a large variability (respectively, mean $\pm$ sd: $1.22\pm0.87\text{ng/mL}$ and $1.56\pm2.26\text{ng/mL}$; median 1.30 and 0.90ng/mL ; 25-75 quartile 0.28-1.90 and $0.40\text{-}1.70\text{ng/mL}$). In those groups, P4 concentrations were low, but non-basal. In the NP group, 20 samples were above the lowest P4 concentration observed in the pregnant Bison cows, whereas 12 were below. As previously mentioned, only a few values were available in 1TP, but they are suggesting a slow P4 increase (Figure 2). Progesterone concentrations were increased in 2 and 3TP when compared to B and NP ($p<0.0001$), but did not differ between 2 and 3TP, and also showed large variability (respectively $9.33\pm4.29\text{ng/mL}$ and $11.21\pm3.68\text{ng/mL}$; $p>0.05$). A significant positive, but weak

correlation was observed between PAG and P4 ($p<0.0001$; $r=0.52$) in all the pregnant American Bison cows.

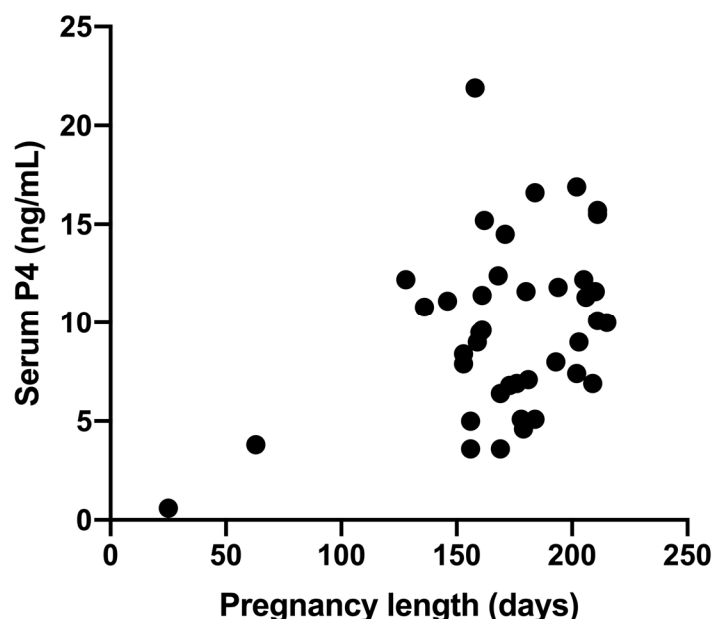


Figure 2: Progesterone (P4) concentration assayed by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry in ng/mL evolution during American Bison pregnancy in days

3.4. Estrone (E1) and Estrone Sulfate (E1S) evolution during bison pregnancy

Estrone was basal in B and NP and did not differ between these 2 groups ($p>0.05$; respectively $2.0\pm0.0\text{pg/mL}$ and $2.47\pm2.89\text{pg/mL}$ with a 2.0ng/mL median). In 1TP, E1 concentrations of the few samples were under the LLOQ values (2.0pg/mL). In 2 and 3TP, E1 concentrations differed (respectively $28.96\pm21.29\text{pg/mL}$ and $49.40\pm31.97\text{pg/mL}$; $p<0.05$) and were both significantly higher than in B and NP ($p<0.01$). A strong correlation ($p<0.0001$; $r=0.76$) was observed between E1 and E1S in pregnant American Bison cows.

In B and NP groups, E1S concentrations were basal and did not differ ($p>0.05$) between the two groups (respectively $0.50\pm0.00\text{ng/mL}$ and $0.52\pm0.12\text{ng/mL}$). The 3 values observed in 1TP were similar to those observed in B and NP. Concentrations in E1S were increased in 2 and 3TP when compared with B and NP (for the different group comparisons, $p<0.01$). In 2TP, E1S concentration was lower ($p<0.0001$) than in 3TP (respectively $3.76\pm2.29\text{ng/mL}$ and $8.23\pm4.46\text{ng/mL}$) and there was a significant moderate positive correlation between the day of pregnancy at sampling and E1S concentration ($p<0.0001$; $r=0.60$). Figure 3 depicts the evolution of E1S during pregnancy.

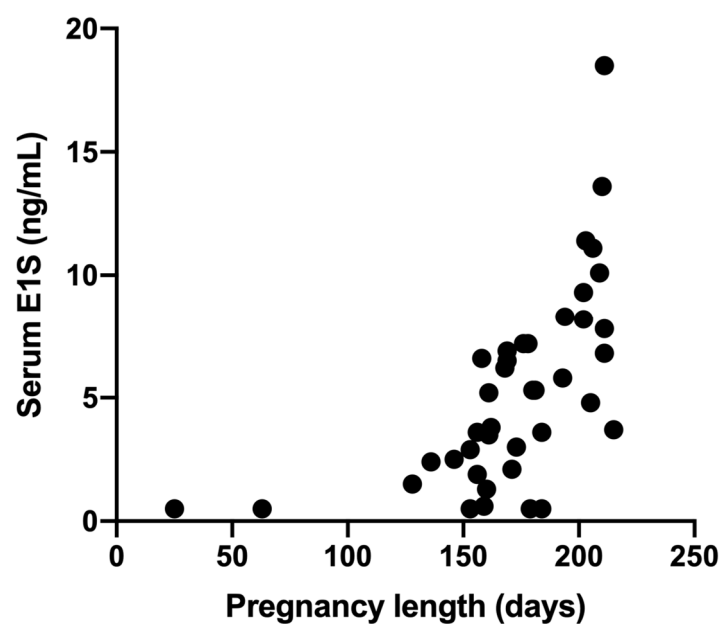


Figure 3: Estrone-Sulfate (E1S) concentration assayed by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry in ng/mL evolution during American Bison pregnancy in days

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the largest number of American Bison blood samples used to compare hormonal levels between males, non-pregnant and pregnant females at various gestation days.

American Bison bulls blood samples, used as negative controls, provide new information. Values of E1 and E1S matched the previously described LLOQ [15], demonstrating that male American Bison do not produce high estrogens levels, as observed in cattle [20], but unlike stallion or boar [21, 22]. Concentrations of P4 observed in American Bison bulls were above the described LLOQ [15] and similar to reported bovine bulls concentrations assayed with immuno-assays [23, 24]. Stress-related progesterone production is observed 15 minutes after electro-ejaculation in Bovine bulls [24]. Thus, the gathering and/or the immobilization in the specific handling/chute system could lead to a stress related P4 increase in the more anxious American Bison bulls and explain the observed high variability.

A large proportion of American Bison cows were non-pregnant, and some issues, as the transient escape of the second ranch' American Bison bull, could explain the low fertility observed in this herd. However, the overall observed fertility is below the beef cow breeding standards [25], but abortion and calving rates per year and per female should only be compared between North-American and Belgian ranches breeding American Bison. Western-Europe rainy temperate climate and over-grazing due to smaller meadows' surfaces could interfere with the American Bison fertility. In the NP group, PAG, E1 and E1S concentrations were similar to their respective MDL or LLOQ [15, 18], making these hormones potential pregnancy markers. In NP animals, P4 concentrations were above the LLOQ [15] and showed high variability, despite our LC-MS assay good reproducibility [15], thus discarding the use of P4 for pregnancy diagnosis, like in other species [8, 26, 27]. Sampling occurred in January, February or early March, when most of the American Bison NP cows should be in anestrus [4]. This variation in P4 levels could also be related to stress induced adrenal progesterone production [28], as discussed for bulls. However, 20 of 32 of these cows had P4 levels above the lowest concentration observed during pregnancy, suggesting they were in diestrus. The breeding season seemed to be extended beyond fall in Belgium, as births occurred mainly in spring (April and May), but were observed until November, as a consequence of a February mating. This difference with wild American Bison, which are mainly calving from May to July [5, 6], is difficult to explain, because light and melatonin related seasonality [26] has not clearly been established yet in American Bison. The Belgian oceanic climate with temperate and rainy winters could explain non-seasonal breeding and calving. Moreover, lower energy intakes due to over-grazing of meadows in fall could also decrease the hypothalamo-hypophysis axis activity

[26] and delay the breeding season. As a consequence, this loss of births' seasonality leads to rise some young calves in mud and cold weather. Moreover, culling decision could be inappropriate, as American Bison cows in early gestation could be considered as non-pregnant by palpation, ultrasonography or available hormonal assays when the herd is gathered in late winter or early spring for mandatory disease screening.

Thanks to this loss of breeding seasonality, samples were collected from American Bison cows at different periods of pregnancy. However, as a limitation of the once-a-year sampling, only tendencies could be described with the few samples collected in 1TP resulting from unlikely mating in winter. Concentration in P4 slowly increased at the beginning of pregnancy, as observed in other ungulates like Reindeers [29], but it could also be related to individual variations. Levels of E1 and E1S were also nearly basal, a priori disabling their use as early gestation marker, but requiring more samples in 1TP. The PAG level was low and basal in 1TP samples, whereas PAG increase with a concentration above 1ng/mL around day 20 in Reindeer [29] and at day 23 in Water Buffaloes [30]. In dairy cows, the first short rise of PAG occurs at day 24 of pregnancy [31] and is followed by a second increase around day 70 [13]. In the present report, a transient peak could have been missed, due to the limited data available in 1TP. An assay for a specific glycoprotein of the PAG family, the PSPB [13], has been validated in American Bison [6] and showed higher concentration (1.42 ± 1.29 ng/mL) in early pregnancy (0-45 days) than our total PAG assay. Despite our caprine PAG RIA kit showed the best detection of the American Bison PAG epitopes, the different sensitivities of the assays could explain those diverging results. Moreover, high PSPB concentration variability was observed during this period [6] and information about PSPB evolution in time and levels in non-pregnant animals were not reported [6]. More data about the PAG evolution in early American Bison pregnancy are required to use our PAG RIA and to explain the differences with the semi-quantitative BIO-PRYN ELISA for PSPB [6].

In 2 and 3TP, PAG concentrations were dramatically below those observed at peak in dairy cows [32], but were similar to those observed in Water Buffaloes [30]. Total PAG concentrations observed in our study during the 2 last trimesters of American Bison pregnancies were above those observed with the specific PSPB assay in mid and late gestation [6], conversely to the observations in 1TP. In the present cohort of American Bison, like in Water Buffaloes [30], no PAG peak was observed during the two last trimesters of pregnancy. This could also results from the large variability in PAG concentrations observed in American Bison pregnant cows, which could be explained by the mating season, and, as reported in dairy cows or goats, the parity [13, 33] or the fetal sex [32]. Moreover, as a limitation, no samples were available in the end of 3TP, and it could hide a late PAG or P4 peak in

American Bison pregnant cows, as P4 inter-individual variability was large and didn't show either a peak in 2 or 3TP. The good reproducibility of our LC-MS cannot explain this variability [15], but factors modulating the molecular regulation of the placental P4 production could be involved, like nutritional stress that has been already described in bovine [34-36] and stress-related adrenal production [28]. Like in other species [8, 26, 27], P4 production in non-pregnant cows disables its use as an specific pregnancy marker in American Bison. Constant and high P4 levels observed in 2 and 3TP and correlation between PAG and P4 at the end of pregnancy suggest that placenta could contribute to P4 production in the 2 last trimesters of American Bison pregnancy.

The high E1 and E1S concentrations in 2 and 3TP, as well as their basal value in NP animals, make these hormones potential pregnancy markers after day 93 in American Bison. The strong correlation between E1 and E1S in pregnant American Bison and the low E1 concentrations (in pg/mL) when compared with E1S (in ng/mL) suggest that E1 should be considered as a trace of estrogens metabolism. E1S production has been described in late pregnancy of mares [37], reindeer [29], ewes [38], goats [33], buffalos [39], cows [40], and many other ungulates [41]. Estrogen production in pregnant American Bison was reported in early studies [5], but without identifying the involved estrogens, and only in feces of a small number of animals with approximative assessment of the pregnancy day. As observed in Buffaloes [39] and in various breeds of cattle [40], present data show that blood estrogens level are rising in the 2TP and continue to increase in the 3TP. In American Bison, E1S production seems to be correlated with the pregnancy day. In 2TP, E1S concentration was higher in American Bison than in beef cows [40]. At 220 days, E1S levels in American Bison were similar those of beef cows [40], but below those observed in Buffaloes [39]. However, Immuno-Assays used in cows [40] and buffaloes [39] precludes any definitive comparisons with our LC-MS results. The LC-MS method developed by our team [15] doesn't explain the inter-individual variability observed for the same pregnancy period in American Bison samples. Calf weight at birth or other factors, as described for beef cattle [40], are more likely to be involved in this variability. Origin of E1S has been located in the placenta of many ungulates, like horses [27] and more precisely in the cotyledonary portion of the placentome in ruminants [42]. The evolutionary proximity of the studied species and the similar evolution of E1S during pregnancy suggest that estrogens are also mainly originating from the placenta during the American Bison pregnancy.

5. Conclusion

As a conclusion, breeding extensively American Bison in Belgium resulted in less than 60% of the females giving birth per year. Lengthening of the breeding season leading to a loss of births' seasonality is also observed and is jeopardizing the life of calves born in autumn. In American Bison like in many other species, progesterone assay is not useful for pregnancy diagnosis. Estrone-sulfate seems to be a pregnancy marker of interest during the 2 last trimesters as its assay could give an estimation of the gestation period, in opposition to PAG that does not increase significantly during the last 6 months of American Bison pregnancy.

Acknowledgements

Authors would like to thank Candice Leroy, Laurent Naveau and all the team of the Bison Ranch, located in Orchimont, Vresse Sur Semois, Belgium and M. Jérémie Van Ael from Lignièrès, Belgium. Authors also would like to thank Prof. J.-F. Beckers, Dr. Marta David and Dr. Coralie Lagamme for their help in different steps of the protocol. Authors would also like to thank Dr. Anne-Françoise Rousseau for her careful reviewing of the paper.

6. Bibliography

1. McCorkell, R.B., M.R. Woodbury, and G.P. Adams, *Serial ovarian ultrasonography in wild-caught wood bison (Bison bison athabasca)*. Theriogenology, 2013. **80**(5): p. 552-6.
2. Matsuda, D.M., et al., *Endocrine and Behavioral events of estrus cyclicity and synchronization in Wood Bison (Bison bison athabasca)*. Theriogenology, 1996. **45**: p. 1429-1441.
3. Kirkpatrick, J.F., et al., *Oestrous cycle of the North American bison (Bison bison) characterized by urinary pregnanediol-3-glucuronide*. J Reprod Fertil, 1991. **93**(2): p. 541-7.
4. Cervantes, M.P., et al., *In vivo and in vitro maturation of oocytes collected from superstimulated wood bison (Bison bison athabasca) during the anovulatory and ovulatory seasons*. Anim Reprod Sci, 2016. **173**: p. 87-96.
5. Kirkpatrick, J.F., K. Bancroft, and V. Kincy, *Pregnancy and ovulation detection in bison (Bison bison) assessed by means of urinary and fecal steroids*. J Wildl Dis, 1992. **28**(4): p. 590-7.
6. Love, D.M., M.T. Mefford, and J.C. Ramer, *Validation of the BioPRYN enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pregnancy-specific protein-B (PSPB) and diagnosis of pregnancy in American bison (Bison bison)*. Reprod Domest Anim, 2017. **52**(5): p. 791-797.
7. Kiewisz, J., et al., *Isolation of pregnancy-associated glycoproteins from placenta of the American bison (Bison bison) at first half of pregnancy*. Gen Comp Endocrinol, 2008. **155**(1): p. 164-75.
8. Henricks, D.M., et al., *Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows*. Endocrinology, 1972. **90**(5): p. 1336-42.
9. Bella, A., et al., *Western analyses of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) in placental extracts of various mammals*. Theriogenology, 2007. **68**(7): p. 1055-66.
10. Kiewisz, J., et al., *Identification of multiple pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) purified from the European bison (Eb; Bison bonasus L.) placentas*. Anim Reprod Sci, 2009. **112**(3-4): p. 229-50.
11. Szafranska, B., et al., *Chorionic mRNA expression and N-glycodiversity of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) of the European bison (Bison bonasus)*. Anim Reprod Sci, 2005. **88**(3-4): p. 225-43.
12. Haigh, J.C., et al., *Diagnosis of pregnancy in wood bison using a bovine assay for pregnancy-specific protein B*. Theriogenology, 1991. **36**(5): p. 749-54.
13. Ricci, A., et al., *Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis*. J Dairy Sci, 2015. **98**(4): p. 2502-14.
14. Raeside, J.I., *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, 2017. **90**(3): p. 449-461.

15. Dufour, P., et al., *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*s. Res Vet Sci, 2021. **136**: p. 343-350.
16. Perenyi, Z.S., et al., *Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma*. Reprod Domest Anim, 2002. **37**(2): p. 100-4.
17. Greenwood, F.C., W.M. Hunter, and J.S. Glover, *The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity*. Biochem J, 1963. **89**: p. 114-23.
18. Skelley, D.S., L.P. Brown, and P.K. Besch, *Radioimmunoassay*. Clin Chem, 1973. **19**(2): p. 146-86.
19. Sprinkle, J.E., et al., *Grazing behavior and production for lactating cows differing in residual feed intake while grazing spring and summer rangeland*. Transl Anim Sci, 2021. **5**(2): p. txab063.
20. Juniewicz, P.E. and B.H. Johnson, *Episodic fluctuation of total estrogens in peripheral blood of bulls: effects of estradiol-17 beta on LH and testosterone secretion*. Biol Reprod, 1980. **23**(5): p. 1029-37.
21. Illera, J.C., et al., *Amplified androstenedione enzymeimmunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse: comparison with testosterone and estrone sulphate methods*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **84**(2-3): p. 377-82.
22. Raeside, J.I., *The formation of unconjugated and sulfoconjugated estrogens by Leydig cells of the boar testis*. Can J Biochem Cell Biol, 1983. **61**(7): p. 790-5.
23. Thompson, J.A., et al., *Ratios of serum concentrations of testosterone and progesterone from yearling bulls with small testes*. Theriogenology, 1994. **41**(5): p. 1045-52.
24. Whitlock, B.K., et al., *Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls*. Theriogenology, 2012. **78**(4): p. 737-46.
25. Hanzen, C., Y. Laurent, and W.R. Ward, *Comparison of reproductive performance in Belgian dairy and beef cattle*. Theriogenology, 1994. **41**(5): p. 1099-114.
26. Senger, P.L., *Pathways to pregnancy and parturition*. 3rd ed. 2015.
27. Conley, A.J., *Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare*. Theriogenology, 2016. **86**(1): p. 355-65.
28. Hollenstein, K., et al., *Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress*. Anim Reprod Sci, 2006. **93**(3-4): p. 292-302.
29. Ropstad, E., et al., *Endocrinology of pregnancy and early pregnancy detection by reproductive hormones in reindeer (Rangifer tarandus tarandus)*. Theriogenology, 2005. **63**(6): p. 1775-88.

30. Barbato, O., et al., *Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) concentrations in water buffaloes (Bubalus bubalis) during gestation and the postpartum period*. Theriogenology, 2017. **97**: p. 73-77.
31. Reese, S.T., et al., *Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation*. Theriogenology, 2018. **106**: p. 178-185.
32. Zoli, A.P., et al., *Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis*. Biol Reprod, 1992. **46**(1): p. 83-92.
33. Singh, S.P., et al., *Temporal changes in plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein, progesterone and estrone sulfate associated with fetal number during early- and mid-pregnancy in goats*. Anim Reprod Sci, 2019. **205**: p. 115-125.
34. Shemesh, M., et al., *Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells*. Biol Reprod, 1994. **51**(1): p. 146-51.
35. Izhar, M., M. Pasmanik, and M. Shemesh, *Bovine placental progesterone synthesis: comparison of first and second trimesters of gestation*. Biol Reprod, 1992. **46**(5): p. 846-52.
36. Shemesh, M., *Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review*. Reprod Fertil Dev, 1990. **2**(2): p. 129-35.
37. Ousey, J.C., *Peripartal endocrinology in the mare and foetus*. Reprod Domest Anim, 2004. **39**(4): p. 222-31.
38. Deayton, J.M., I.R. Young, and G.D. Thorburn, *Early hypophysectomy of sheep fetuses: effects on growth, placental steroidogenesis and prostaglandin production*. J Reprod Fertil, 1993. **97**(2): p. 513-20.
39. Hung, N.N. and B.S. Prakash, *Influence of gestation on blood plasma concentrations of oestrone and oestrone sulphate in Karan Swiss cows and Murrah buffaloes*. Br Vet J, 1990. **146**(5): p. 449-56.
40. Isobe, N., et al., *Plasma concentration of estrone sulfate during pregnancy in different breeds of Japanese beef cattle*. J Reprod Dev, 2003. **49**(5): p. 369-74.
41. Geyer, J., et al., *The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017. **172**: p. 207-221.
42. Schuler, G., et al., *Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation?* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2008. **116**(7): p. 429-36.

Section expérimentale

Etude 2 :

Analysis of progesterone and estrone-sulfate in feces of American Bison using liquid chromatography coupled to mass spectrometry: technical validation and correlation with blood levels

<i>Domestic Animal Endocrinology 86 (2024) 106819</i>

Patrice DUFOUR, **Vincent FRISEE**, Goulven RIGAUX, Flore BRUTINEL, Sophie EGYPTIEN, Philippe BOSSAERT, Jessica DELEERSNYDER, Stéfan DELEUZE, Stéphanie PEETERS, Caroline LE GOFF, Jérôme PONTIER, Etienne CAVALIER

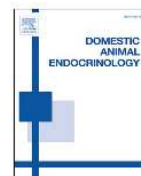
Préambule

La première étude a permis d'établir des valeurs de référence des concentrations sériques en PAGs, P4, E1 et E1s chez les bisons d'Amérique mâles et femelles, gestantes ou non. Les dosages sériques des PAGs, de l'E1 et de l'E1S ont permis de différencier les femelles gestantes en 2 et 3TP des mâles ou femelles non gestantes. Les concentrations sériques en E1S ont permis de différencier les femelles gestantes en 2TP de celles en 3TP. Cependant, la nature sauvage du bison d'Amérique complique le prélèvement d'échantillons sanguins pour étudier les profils hormonaux. Dans ce contexte, une étude a été réalisée afin de mettre au point une méthode de dosage de la P4 et de l'E1S dans les matières fécales de bisons d'Amérique par LC-MS/MS.

Des échantillons de matières fécales ($n = 73$) ont été prélevés chez des bisons d'Amérique mâles, femelles gestantes et non gestantes dans les mêmes ranchs belges que la première étude. Les échantillons d'excréments (500 mg) ont été extraits au méthanol, purifiés et concentrés. Ensuite, les échantillons de matières fécales et de sérum ont été dosés par LC-MS/MS, selon la technique décrite précédemment. L'homogénéité de la matrice fécale a été déterminée par dosage des stéroïdes dans différentes zones de l'échantillon, et l'évolution des concentrations a été évaluée après stockage à température ambiante.

Lors du processus de validation, les limites inférieures de quantification étaient de 20 pg/g (E1S) et 4 ng/g (P4) en respectant les critères suivants : écart type relatif inférieur à 15 % et biais relatif inférieur à 15 %. En mesurant les hormones à différents points du même échantillon, une variabilité modérée pour l'E1S (coefficient de variation (CV) jusqu'à 21,3 %) et une forte variabilité pour la P4 (CV jusqu'à 85,5 %) ont été mises en évidence. La corrélation entre les concentrations dans les matières fécales et dans le sérum était plus élevée pour l'E1S ($r = 0,77$) que pour la P4 ($r = 0,65$). La P4 a pu être dosée chez les femelles gestantes et non gestantes, tandis que l'E1S n'était présent que chez les femelles gestantes. Le stockage des matières fécales à température ambiante a induit une modification des concentrations de stéroïdes.

La quantification de l'E1S et, à un niveau moindre, de la P4 dans les matières fécales constitue une alternative intéressante au dosage sérique pour décrire l'évolution de ces stéroïdes liée à la gestation chez les bisons d'Amérique. Les matières fécales devraient idéalement être conservées congelées et mélangées avant les procédures de LC-MS/MS.



Analysis of progesterone and estrone-sulfate in feces of American Bison using liquid chromatography coupled to mass spectrometry: Technical validation and correlation with blood levels

Patrice Dufour^a, Vincent Frisée^b, Goulven Rigaux^c, Flore Brutinel^d, Sophie Egyptien^d, Philippe Bossaert^b, Jessica Deleersnyder^a, Stéfan Deleuze^d, Stéphanie Peeters^a, Caroline Le Goff^a, Jérôme Ponthier^{d,*}, Etienne Cavalier^a

^a Clinical Chemistry, University Hospital (CHU), Liège University, Belgium

^b Production Animals Department, Liège University, Belgium

^c Pan Anima, Tournai, Belgium

^d Theriogenology, Liège University, Belgium

Abstract

American Bisons wild nature limits blood samples availability to study its endocrinology. This report describes progesterone (P4) and estrone-sulfate (E1S) assays in American Bison feces using Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS).

In 2 ranches, feces (n=73) and serum (n=93) samples were collected in pregnant and non-pregnant American Bisons. Feces samples (250 mg) were extracted with methanol, purified and concentrated. Then, feces and serum samples were assayed using LC-MS, according to our previously described technique. Fecal matrix homogeneity was determined by measuring steroids in different areas of the sample and concentrations evolutions were evaluated after storage at room temperature.

During the validation process, lower limits of quantification were 20 pg/g (E1S) and 4 ng/g (P4) by meeting the following criteria: relative standard deviation <15% and relative bias <15%. By measuring hormones in different spots from the same sample, a moderate variability for E1S (coefficient of variation (CV) up to 21.3%) and a high variability for P4 (CV up to 85.5%) were highlighted. Correlation between concentrations in feces and in serum was higher for E1S (r=0.77) than for P4 (r=0.65) and P4 could be assayed in pregnant and non-pregnant animals whereas E1S was only present in pregnant. Feces storage at room temperature induced modification of steroids concentrations.

The quantification of E1S and, in a lower level, of P4 in feces is an interesting alternative to serum assay to describe pregnancy-related evolution of these steroids in American Bisons, with feces ideally stored frozen and mixed before the LC-MS procedures.

1. Introduction

Due to American Bison wild character and its extensive breeding management, blood samples availability is limited (McCorkell et al., 2013) and reproductive endocrinology of non-pregnant and pregnant animals is poorly described. Bison estrus cycle has been estimated to be around 21 days (Kirkpatrick et al., 1991; Matsuda et al., 1996). They exhibit 5-6 cycles (Matsuda et al., 1996) during the ovulatory season in autumn, whereas an anestrus is observed during the rest of the year (Cervantes et al., 2016). In a natural environment, American Bison calving season is spring (May to July) after around 260 to 285 days of gestation (Kirkpatrick et al., 1992; Love et al., 2017; Vervaecke and Schwarzenberger, 2006), although breeding season, grazing areas and nutrition could modulate this duration (Love et al., 2017; Vervaecke and Schwarzenberger, 2006). The endocrinology of American Bison and bovine gestations seems to share common features, such as production of Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) (Frisee et al., 2022; Kiewisz et al., 2008; Love et al., 2017) and estrogens (Dufour et al., 2021; Frisee et al., 2022; Isobe et al., 2003; Kirkpatrick et al., 1992).

Recent studies using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS) in American Bison (Dufour et al., 2021; Frisee et al., 2022) showed that Progesterone (P4) was slowly increasing in serum during the first trimester of American Bison pregnancy and seemed to be steady in its 2 last trimesters. However, P4 concentrations were high in some bulls or non-pregnant cows, and a large P4 interindividual variation was observed in pregnant American Bison (Frisee et al., 2022). Estrone (E1) and estrone-sulfate (E1S) productions were observed in 2nd and 3rd trimesters of pregnancy, but E1 seemed to be a residue of the placental production of E1S (Frisee et al., 2022). Despite E1S interindividual variability, it was constantly increasing in American Bison sera during pregnancy (Frisee et al., 2022).

However, collection of blood samples requires gathering and immobilization of American Bison that could induce stress and injuries, as previously suggested (Whitlock et al., 2012). Urinary and fecal sexual steroids assays are potential alternative solutions already tested in early studies on small numbers of American Bison at the third month of pregnancy (Kirkpatrick et al., 1992). In practice, urine is difficult to collect and only total estrogens were assayed in pregnant Bison cows' feces, without information about the type of estrogen produced (Kirkpatrick et al., 1992), whereas P4 has been quantified in feces of super-ovulated American Bison cows (Othen et al., 1999). Immuno-assays were used (Kirkpatrick et al., 1992; Othen et al., 1999), and, they are not always properly validated to determine steroids concentration in the species' biological matrix (Dufour et al., 2021; Raeside, 2017), which may cause variations

in the observed levels. As steroids blood levels in American Bisons were unknown, correlations between fecal and blood concentrations were not assessed (Kirkpatrick et al., 1992).

This study aimed to develop a LC-MS method to determine P4 and E1S concentrations in American Bison feces. Correlations between fecal and serum steroids concentrations were determined to evaluate physiological relevance of the feces assay. Homogeneity of E1S and P4 concentration in feces was tested and stability of those concentrations during storage at room temperature was assessed.

2. Material and Methods

2.1. Animals and sampling

In the Belgian Ardennes ($\pm 50^\circ\text{N}$), 2 ranches are extensively breeding wild American Bison (*Bison bison*) imported from Montana (USA) since 1998 and 2004, respectively. Animals are freely grazing in meadows previously dedicated to beef cattle. The first breeding herd is divided in 2 separate meadows of 19 and 21 ha, each welcoming 2 sexually mature American Bison bulls and respectively 25 and 26 sexually mature cows. In the second ranch, 10 sexually mature American Bison cows are roaming freely with one sexually mature bull in a 15ha meadow. In both ranches, American Bison are not used to human presence and to manipulations. Once a year, animals are gathered and immobilized for mandatory diseases screening in a specific handling/chute system. Between January and February 2019, and between February and March 2020, this opportunity was used to collect blood in 2 dry tubes by venipuncture under the tail of all matures American Bison. Only mature animals which reached sufficient size to be pubescent were sampled. Blood samples were centrifuged ($1000 \times g$ for 10 min) and stored frozen (-80°C) until assays. Feces were also collected by rectal palpation ($\pm 50\text{mL}$) and were stored frozen (-20°C) within 6 hours after collection until assays. Among the 5 American Bison bulls, 2 were sampled in 2019 and 2020. Among the 93 serum samples of American Bison cows, 52 were collected twice on the same animal in 2019 and 2020. Of the 73 feces samples of American Bison cows, 10 were collected twice on the same animal in 2019 and 2020.

Calving days of the American Bison cows were recorded for the year following the sampling procedures. Fertilization day of cows that calved was retrospectively obtained by subtracting 276 days of the calving day. Gestation day on sampling day was then determined by subtracting the fertilization day of the sampling day. Other events, such as abortion, disease, culling or prolonged gestation (more than 276 days after sampling) were reported by the breeders during the following year.

2.2. Chemicals and reagents

Reference standard and internal standard solutions were prepared from powder of E1S sodium salt and d_4 -estrone-3-sulfate sodium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in methanol and solutions of P4 and d_9 -progesterone (Cerilliant, Round Rock, TX, USA). Water, acetonitrile, hexane and methanol (LC-MS grade) were purchased from Biosolve (Biosolve, Dieuze, France). Ammonia solution (25% in water) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was Suprapur[®] grade and was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Homemade

quality controls and calibrator samples were made by spiking standards in 500 mg of feces collected from cattle (*Bos taurus*) before extraction.

2.3. Progesterone (P4), Estrone-sulfate (E1S) assays in serum

Sexual steroids (P4, E1S) were assayed with our previously validated and described for American Bison LC-MS technique (Dufour et al., 2021). For P4 and E1S, Lower Limit of Quantification (LLOQ), defined as the lowest concentration in the validation standards that reported Relative Standard Deviation (RSD) and Relative Bias (RB) lower than 15%, were established at respectively 0.1 ng/mL and 0.5 ng/mL (Dufour et al., 2021; Frisee et al., 2022).

2.4. Feces sample preparation and LC-MS

Five hundred mg (± 50 mg, weighed precisely) of calibrator, quality control or American Bison's feces sample were spiked with 10 μ L of internal standard mixture (d_4 -E1S at 10 ng/mL and d_9 -P4 at 400 ng/mL) before extraction. Two mL of methanol were added to the spiked feces, the mixture was vortexed for 10 sec and then sonicated for 15 min. Mixture was centrifuged ($1000 \times g$ during 5 min) and the supernatant was collected and transferred to a glass tube. The extraction by methanol was repeated once and the methanol fractions were gathered. The methanol extract was washed with 3 mL of hexane and then evaporated to dryness under vacuum at 40°C overnight. The dry extract was then resolubilized in 100 μ L of a water/acetonitrile (80/20) mixture and transferred in a 2 mL Eppendorf. The mixture was centrifuged at $16100 \times g$ during 10 min and the supernatant was transferred to LC vials before injection into the LC-MS device.

The LC-MS parameters were exactly the same than those described in Dufour et al. (2021) except for injection volume which was set at 40 μ L in the present study. The LC-MS conditions are gathered in Table 1.

Table 1 : LC-MS conditions.

Parameters	Setting
Apparatus LC	Shimadzu Nexera X2 LC-30 CE (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)
Apparatus MS	QTrap 6500 (ABSciex, Framingham, Massachusetts, USA)
Column	BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm particle size) (Acquity UPLC, Waters)
Column temperature	40°C
Mobile phase (A)	0.02% NH ₄ OH in water
Mobile phase (B)	Acetonitrile
Flow rate	0.4 mL/min
Source	Electrospray (negative and positive mode)
Ion spray voltage	-4500V & 5500V
Ion source temperature	650°C

2.5. LC-MS method validation

The whole method process was validated according to the guidelines provided by the USA Food and Drug Administration (FDA). For each validation day, 6 points calibration curves (ranges: 20-1000 pg/g for E1S; 4-200 ng/g for P4) were prepared in duplicate with cattle feces. Integrated peak area ratio between native hormones and marked internal standard was used to calculate response. Intraday precision and accuracy were evaluated by analyzing 5 levels of validation standards prepared in quintuplicate in cattle feces (standard concentration are gathered in Table 2). Interday precision and accuracy were determined by repeating the analysis two more times. Precision corresponds to the relative standard deviation ($RSD = \text{Standard deviation} \times 100 / \text{Mean value}$) and accuracy to relative bias ($RB = (\text{Mean of observed concentrations} - \text{Spiked concentration}) \times 100 / \text{Spiked concentration}$). Lower and upper limits of quantification were defined as the lowest and the highest concentrations, respectively, in the validation standards that reported RSD and RB lower than 15%. Extraction efficiencies and matrix effects were assessed on 2 levels (low: 50 pg/g for E1S and 10 ng/g for P4 and high: 500 pg/g for E1S and 100 ng/g for P4), each level was assessed in triplicate. Extraction efficiency indicated the percentage of hormone extracted from the matrix and was computed

by the ratio of the area measured after extraction and the area determined in post extraction spiked samples. Matrix effect reflects the effect of the matrix on the compound ionization, this effect could be positive (ionization enhancement) or negative (ionization suppression). Matrix effects were determined by the difference in percent between the ratio of area measured for the compounds and the area determined for the corresponding internal standard in a post extraction spiked standard and the same ratio for pure standards.

Table 2 : Intra-day and inter-day accuracy and precision of estrone 3-sulfate and progesterone. These parameters were measured with validation standards prepared in cattle feces. Validation standards were analyzed in quintuplicate during the first day (intra-day variation) and then in triplicate during 3 days (inter-day variation).

	E1S			P4		
	Target (pg/g)	RSD	RB	Target (ng/g)	RSD	RB
Intra-day						
Level 1	20	12.0%	2.9%	4	3.4%	2.1%
Level 2	30	7.8%	-1.9%	6	4.2%	5.6%
Level 3	50	9.0%	2.3%	10	4.5%	6.1%
Level 4	800	5.4%	0.0%	160	3.2%	0.1%
Level 5	1000	7.2%	3.6%	200	4.5%	2.6%
Inter-day						
Level 1	20	10.9%	8.6%	4	2.2%	-0.4%
Level 2	30	5.5%	6.1%	6	1.8%	1.5%
Level 3	50	11.8%	5.2%	10	3.6%	2.3%
Level 4	800	8.0%	1.6%	160	1.4%	-2.2%
Level 5	1000	5.8%	0.7%	200	3.3%	-0.4%

Precision refers to the relative standard deviation ($RSD = \text{Standard deviation} \times 100 / \text{Mean value}$) and accuracy to relative bias ($RB = (\text{Mean of observed concentrations} - \text{Spiked concentration}) \times 100 / \text{Spiked concentration}$).

2.6. Homogeneity of fecal matrix and stability during storage at room temperature

To assess homogeneity of fecal samples, 4 entire and unmixed feces from 4 different pregnant American Bison cows were collected shortly after the emission on the field and steroid hormones were determined in split samples taken from top, bottom, left and right part of each fecal sample. In order to assess stability of steroids in feces, in samples 1 and 2, the left part of the feces was homogenized and an aliquot was left at ambient temperature (15-25°C) during 24 hours and another for 96 hours before being analyzed. Stability at ambient temperature was also assessed in feces from a non-pregnant female and another fecal sample from an American Bison bull.

2.7. Statistics

Software R Studio was used (version 3.4.1; R Project for Statistical Computing) and statistical significance was established at $p < 0.05$ for this double-blind prospective study. Normal distribution of values was tested with Shapiro-Wilk test.

Spearman correlation *test* was used to determine correlations between serum and fecal hormones' concentrations. For E1S, correlation was only tested on the pregnant female cohort since E1S concentrations in serum and feces were below the limit of quantification in all males and non-pregnant females.

3. Results

During the validation process, correlation coefficients (r^2) for the calibration curve were observed to be greater than 0.99. Calibration curves were calculated using 1/x-weighted quadratic regression. The intra- and inter-day accuracy and precision determined during the validation process are summarized in Table 2. For both steroids and for each concentration tested, RSDs were less than 15% (RSD ranged from 1.4% to 12.0%), while RBs were less than 10% (ranging from -2.2% to 8.6%). Therefore, the limits of quantification (LOQ) of the method were set at 20 pg/g and 4 ng/g for E1S and P4, respectively. Extraction efficiencies were 63% (CV: 22%) and 67% (CV: 11.2%) for E1S in low and high levels samples respectively, while lower extraction efficiencies for P4: 13% (CV: 9.1%) and 9% (CV: 21.8%) were observed in low and high levels samples respectively. Matrix effects were 2.4% (CV: 13.7%) and -11.5% (CV: 5.2%) for E1S in low and high levels samples respectively and 24.5% (CV: 10.4%) and 19.7% (CV: 23.4%) for P4, in low and high levels samples respectively.

Homogeneity of the feces was tested by measuring the steroids in different parts of samples collected from pregnant females. The results are gathered in Table 3. The variation observed for E1S was moderate, (coefficients of variation (CVs) ranging from 9.4% to 21.3%), but the variability for P4 was higher since the CVs observed in the four samples were above 15% and reached 85.5% in sample B.

Table 3 : Homogeneity of bison fecal samples

	Bison A		Bison B		Bison C		Bison D	
	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)
Top	40.1	6.2	61.8	118.0	117.1	5.9	293.7	58.3
Left	52.5	3.9	50.6	34.7	154.5	4.8	252.1	40.3
Right	44.4	4.1	55.4	32.9	189.3	6.4	287.0	33.6
Bottom	43.2	4.2	51.3	22.1	131.3	4.2	324.3	28.0
CV	11.7%	23.8%	9.4%	85.5%	21.3%	18.9%	10.2%	32.9%

Regarding stability, in pregnant females, different kinetics were observed for the two molecules: after 24 h at room temperature, both hormone levels increased, but after 96 h, E1S levels continued to increase, while P4 levels decreased. In non-pregnant females and males, E1S levels remained unquantifiable after 24 and 96 hours of incubation at room temperature. Conversely, the kinetics of P4 were similar to those observed in pregnant females: an increase of P4 was observed from concentrations below the LOQ at t_0 , to measurable levels after 24h of incubation and then a return to levels below the LOQ after 96h of incubation (Table 4).

Table 4: Steroid stability in fecal samples

	Bison A (pregnant)		Bison B (pregnant)		Bison E (not pregnant)		Bison F (male)	
	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)	E1S (pg/g)	P4 (ng/g)
0h	40.1	6.2	61.8	118.0	<20	<4	<20	<4
24h	132.9	12.9	74.9	>200	<20	20.2	<20	5.9
96h	>1000	< 4	>1000	26.4	<20	<4	<20	<4

Table 5 gathers concentrations of steroids measured in feces of males, non-pregnant females and pregnant females. P4 was detected in all samples from pregnant females (median concentration = 21.1 ng/g; range: 5.03 – 266 ng/g) but also in 2 out of 4 males (median concentration = 5.84 ng/g; range: < 4 – 5.93 ng/g) and 11 out of 34 non-pregnant females (median concentration = < 4 ng/g; range: < 4 – 27.8 ng/g).

Table 5: median and range of concentrations for estrone sulfate (E3S) and progesterone (P4) in feces samples from males, pregnant females and not pregnant females.

	n	E1S (pg/g)		P4 (ng/g)	
		Median	Range	Median	Range
Males	4	< LOQ	< LOQ - < LOQ	5.84	< LOQ - 5.93
Pregnant females	35	250	< LOQ - 2698	21.1	5.03 - 266
Not pregnant females	34	< LOQ	< LOQ - < LOQ	< LOQ	< LOQ - 27.8

The non-parametric correlation between feces and serum P4 levels was statistically significant ($p < 0.001$) but moderate ($r = 0.65$) with outliers (Figure 1). E1S is a good biomarker to discriminate pregnant females from non-pregnant females and males, indeed, E1S was not detected in any samples from males or non-pregnant females. In pregnant females, the median concentration was 250 pg/g (range: $< 20 - 2698$ pg/g). E1S concentration in feces was below the LOQ in 2 out of the 35 pregnant females showing also E1S and P4 below the LOQ in the serum: one of these American Bison cows was in the first trimester of pregnancy while the other had a spontaneous abortion shortly after the sampling. The correlation between serum and feces E1S concentration in pregnant females is significant ($p < 0.001$) and good ($r = 0.77$) (Figure1).

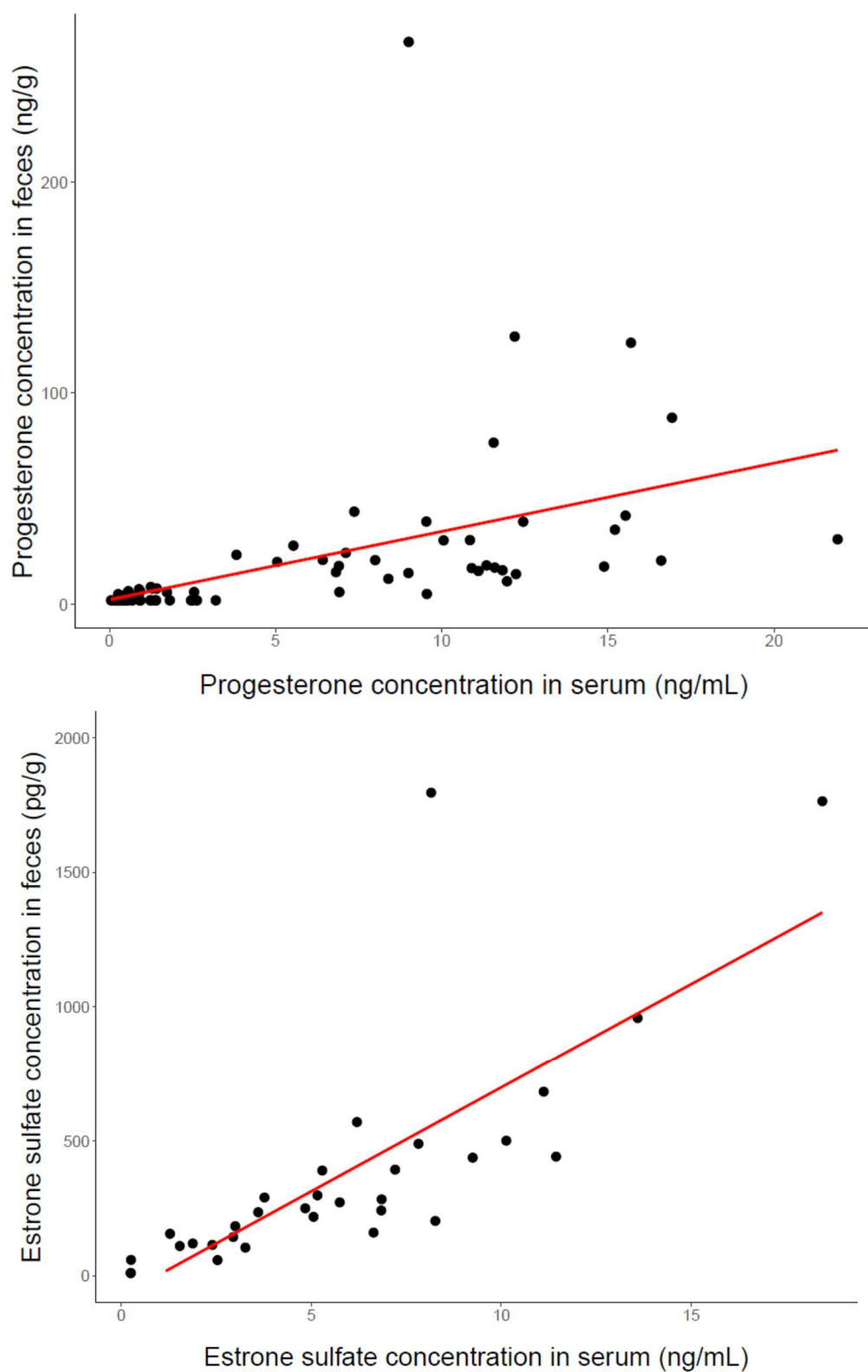


Figure 1: correlations between progesterone and estrone-sulfate concentration measured in serum and those determined in feces samples.

4. Discussion

Our previous study showed that serum E1S is an excellent biomarker to discriminate American Bison cows in their second or third trimester of pregnancy from males and non-pregnant females, whereas data in the first trimester of pregnancy were lacking due to the small number of Bison available in this period (Dufour et al., 2021; Frisée et al., 2022). However, although serum E1S appears to be a good parameter for diagnosing pregnancy, its use on a large scale for herd monitoring is hampered by the need for immobilization and the associated risks for the animal and the medical team (McCorkell et al., 2013). Using our previous results about steroids concentrations in serum, this study aimed to describe their assay on an easily available matrix: the American Bison feces.

This study demonstrates that quantification of E1S in feces using LC-MS is an efficient method to identify pregnant females. Many studies showed that fecal estrogens (conjugated or not) are good marker for pregnancy in several species: in cow (Möstl et al., 1984), sows (Choi et al., 1987; Ohtaki et al., 1999), red buffalos, yaks, Nubian ibex (Safar-Hermann et al., 1987), zebras (Chapeau et al., 1993; Ncube et al., 2011; Safar-Hermann et al., 1987), gorillas, sable antelopes, tapirs (Chapeau et al., 1993), kiang mares (Kuckelkorn, 1994), white-tailed deers (Kapke et al., 1999) and caribous (Messier et al., 1990), while estrone conjugates were not able to discriminate pregnant animals in big horn sheep (Schoenecker et al., 2004). However in all these studies, not-specific immunoassays were used to measure estrogens concentrations, except in Ohtaki et al., 1999 where E1S is specifically determined. Therefore, the real identity of the estrogens is difficult to establish and the correlation between serum and feces concentrations was not always assessed.

The E1S median concentration observed in this study for pregnant females (250 pg/mL) was lower than those observed in an earlier study (Kirkpatrick et al., 1992), where total sulfonated estrogens were assayed using RIA. All pregnant females presented E1S levels above the LOQ of 20 pg/g in feces, except one that was in the first trimester of pregnancy (the only available animal in this period), and another one that spontaneously aborted shortly after the sampling. None of the male and non-pregnant female feces samples showed measurable levels of E1S. Therefore, if we exclude the case of abortion, the sensitivity of E1S in feces to diagnose second or third trimester pregnancy was 100% in our population. The high correlation observed between serum and feces E1S concentration was never reported in Bison, nevertheless, Ohtaki et al., 1999 reported a high correlation ($r^2=0.82$) between the plasma and the fecal concentrations of E1S in sows. Therefore, feces E1S concentration could be an useful tool to

estimate the pregnancy period, as it was suggested in serum (Frisee et al., 2022). Moreover, this diagnosis performance seemed not to be affected by storage at ambient temperature, since E1S levels in feces stored up to 96 hours increased in pregnant American Bison cows and remained below the LOQ in non-pregnant female and male. A long delay between dung emission and sample collection or preanalytical storage in the lab wouldn't interfere on zootechnical results. These promising results should be confirmed and compared to other pregnancy diagnosis methods. Moreover, E1S in feces should also be tested on a larger number of animals in their first trimester of pregnancy.

The association between serum and fecal P4 is moderate, with the Figure 1 showing outliers, what is consistent with the previous studies using commercial device to assay progesterone in different species' feces, with correlation ranging from 0.57 in hippopotamus to 0.79 in okapis (Meunier et al., 2022). The poor homogeneity of fecal samples (CV as high as 85% for P4 concentrations was observed in a sample) could partly explain this moderate correlation, in accordance with the heterogenous distribution of steroids hormones reported in feces, as an example, from brown brocket deer (Tanaka et al., 2019). Therefore, correlation with serum concentration could be improved by a step of homogenization for instance during the collection process before storage at -20°C. Stress induced P4 production observed in cattle (Whitlock et al., 2012) could also explain this lower correlation. Immobilizing American Bisons would lead to variation in serum P4 concentrations depending on the animal's stress, while feces P4 levels wouldn't be immediately modified. Despite the low extraction efficiency for P4, this hormone could be measured in all samples from pregnant females. This low extraction efficiency is due to the wash step during the sample processing, this step was added to enhance the sensitivity for E1S by reducing the background noise signal (the fecal concentrations of E1S are 2 orders of magnitude lower than those of P4) and to increase the lifetime of LC column. Concentrations of P4 observed in feces of pregnant American Bison cows using LC-MS were in the same range than those observed with ELISA in previously super-ovulated Bisons (Othen et al., 1999) and below those of early studies using RIA on small number of pregnant animals (Kirkpatrick et al., 1992). Presence of sulfated progesterone (Wang et al., 2022) or other P4 metabolites (Vervaecke and Schwarzenberger, 2006) could explain this difference, as our LC-MS method was designed to only assay non-conjugated P4 (Dufour et al., 2021). Progesterone was chosen because it is present in blood during the bovine pregnancy and the common precursor of the P4 metabolites. However, an increase in progestins (mainly 20-oxo-pregnane metabolites) has been observed early in the pregnancy, making these steroids potential markers of early pregnancy in feces (Vervaecke and Schwarzenberger, 2006). Unfortunately,

the progestins levels were determined by immuno-assays, therefore it is not possible to exactly identify the metabolites measured. A full characterization of progestins in feces using time-of-flight mass spectrometry or nuclear magnetic resonance spectrometry could be a step forward in the identification of such early pregnancy markers.

Kinetics of steroids concentration during feces storage at room temperature doesn't affect the ability of E1S to be used as a pregnancy diagnosis, whereas P4 increases above LOQ in the first 24h of storage. However, freezing (-20°C) feces as early as possible after collection would be recommended to keep the good correlation with blood levels. With a physiological perspective, observed changes in steroids concentrations during storage at room temperature requires to be investigated. Early studies (Adlercreutz et al., 1984) observed modifications of estrogens concentrations in feces of women receiving antibiotics and already concluded that intestinal flora was involved in estrogen metabolism. More recently, retro-conversion of estrogens in androgens by bacteria (Wang et al., 2020), re-activation of estrogens in gut (Cotton et al., 2023), de-sulfation of progesterone by gut microbiota have been observed (Wang et al., 2022) and could explain observed transitory and continuous increase of P4 and E1S, respectively. Initially, the present study using LC-MS methodology was only designed to measured two steroids: P4 and E1S. However, LC-MS technology is able to quantify numerous compounds simultaneously, and other steroids could be added to the present methodology to precisely study the steroids kinetic in feces. Describing the sexual steroids metabolism in feces would also help to understand the ethological consequences of E1S increase in feces at ambient temperature. Observed modifications in fecal estrogens could have significance for the American Bison herd behavior (Ramachandran et al., 2020), but also for their predators tracking them using tramlines' smell.

Determination of steroids concentration in American Bison feces could be a useful tool to study the changes in steroid levels during the pregnancy or the ovulatory cycle. Serum steroids levels are obviously the most representative biomarkers of the hormonal status of the American Bisons, but the practical issues already mentioned (McCorkell et al., 2013) limit the weekly sampling of American Bison serum to follow changes in steroid concentrations. Feces collection once a week is much easier and could be considered. The correlation with fecal levels of E1S is good and therefore fecal E1S could be considered a good proxy for pregnancy, while P4 results should be interpreted more carefully. The cost of a LC-MS instrument is an obvious limitation of the present methodology, as not all laboratories can afford such equipment. However, as discussed in our previous publication (Dufour et al., 2021), this limitation is counterbalanced by the greater specificity and sensitivity of the LC-MS compared

to immunoassays. Moreover, as a LC-MS equipment is able to quantify a few dozen compounds simultaneously (Dufour et al., 2021; Ledeck et al., 2022; Peris et al., 2007), whereas immuno-assays require a specific kit for each compound assayed. Other steroids such as Estradiol, Estradiol-sulfate, 17 α -hydroxyprogesterone (17 α OHP), dehydroepiandrosterone (DHEA) and progesterone metabolites, sulfonated or not should be assayed with LC-MS to describe the ovulatory cycle and the complete pregnancy endocrinology.

5. Conclusion

The quantification of E1S and, in a lower level, of P4 in feces is an interesting alternative to serum measurement to describe pregnancy-related changes of these steroids in American Bisons, but also in other wild or domestic ungulates species. This tool could also be used to assess the evolution of other steroids during pregnancy in American Bison and other wild ruminants. Nevertheless, in this last case, a particular attention should be paid to preanalytical process, as an important variability inherent to the feces matrix and to their storage conditions should be considered.

Acknowledgements

Authors would like to thank Candice Leroy, Laurent Naveau and all the team of the Bison Ranch, located in Orchimont, Vresse Sur Semois, Belgium and M. Jérémie Van Ael from Lignièrès, Belgium. Authors also would like to thank Dr. Margot Stipulanti, Dr. Ludovic Martinelle, Dr. Marta David and Dr. Coralie Lagamme for their help in different steps of the protocol. Authors would also like to thank Dr. Anne-Françoise Rousseau for her careful reviewing of the paper.

6. Bibliography

- Adlercreutz, H., Pulkkinen, M.O., Hamalainen, E.K., Korpela, J.T., 1984. Studies on the role of intestinal bacteria in metabolism of synthetic and natural steroid hormones. *J Steroid Biochem* 20, 217-229.
- Cervantes, M.P., Palomino, J.M., Anzar, M., Mapletoft, R.J., Adams, G.P., 2016. In vivo and in vitro maturation of oocytes collected from superstimulated wood bison (*Bison bison athabasca*) during the anovulatory and ovulatory seasons. *Anim Reprod Sci* 173, 87-96.
- Cotton, S., Clayton, C.A., Tropini, C., 2023. Microbial endocrinology: the mechanisms by which the microbiota influences host sex steroids. *Trends Microbiol.*
- 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. *Res Vet Sci* 136, 343-350.
- Frisee, V., Rigaux, G., Dufour, P., Barbato, O., Brutinel, F., Egyptien, S., Bossaert, P., Deleuze, S., Cavalier, E., Ponthier, J., 2022. American Bison (*Bison bison*) reproductive endocrinology: serum Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG), Progesterone, Estrone and Estrone-Sulfate in non pregnant animals and during gestation. *Domest Anim Endocrinol* 78, 106684.
- Isobe, N., Nakao, T., Uehara, O., Yamashiro, H., Kubota, H., 2003. Plasma concentration of estrone sulfate during pregnancy in different breeds of Japanese beef cattle. *J Reprod Dev* 49, 369-374.
- Kiewisz, J., Sousa, N.M., Beckers, J.F., Vervaecke, H., Panasiewicz, G., Szafranska, B., 2008. Isolation of pregnancy-associated glycoproteins from placenta of the American bison (*Bison bison*) at first half of pregnancy. *Gen Comp Endocrinol* 155, 164-175.
- Kirkpatrick, J.F., Bancroft, K., Kincy, V., 1992. Pregnancy and ovulation detection in bison (*Bison bison*) assessed by means of urinary and fecal steroids. *J Wildl Dis* 28, 590-597.
- Kirkpatrick, J.F., Kincy, V., Bancroft, K., Shideler, S.E., Lasley, B.L., 1991. Oestrous cycle of the North American bison (*Bison bison*) characterized by urinary pregnanediol-3-glucuronide. *J Reprod Fertil* 93, 541-547.
- Ledeck, J., Dufour, P., Evrard, E., Le Goff, C., Peeters, S., Brutinel, F., Egyptien, S., Deleuze, S., Cavalier, E., Ponthier, J., 2022. Evolution of 17-beta-estradiol, estrone and estrone-sulfate concentrations in late pregnancy of different breeds of mares using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Theriogenology* 189, 86-91.
- Love, D.M., Mefford, M.T., Ramer, J.C., 2017. Validation of the BioPRYN enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pregnancy-specific protein-B (PSPB) and diagnosis of pregnancy in American bison (*Bison bison*). *Reprod Domest Anim* 52, 791-797.

- Matsuda, D.M., Bellem, A.C., Gartley, C.J., Madison, V., King, W.A., Liptrap, R.M., Goodrowe, K.L., 1996. Endocrine and Behavioral events of estrus cyclicity and synchronization in Wood Bison (*Bison bison athabasca*). *Theriogenology* 45, 1429-1441.
- McCorkell, R.B., Woodbury, M.R., Adams, G.P., 2013. Serial ovarian ultrasonography in wild-caught wood bison (*Bison bison athabasca*). *Theriogenology* 80, 552-556.
- Meunier, M., Schwarzenberger, F., Mulot, B., 2022. Use of a simplified non-invasive technic to monitor fecal progesterone metabolites and reproduction function in several zoo species: Efficacy of mini VIDAS(R) automate (bioMerieux). *Theriogenology* 179, 69-77.
- Othen, L.S., Bellem, A.C., Gartley, C.J., Auckland, K., King, W.A., Liptrap, R.M., Goodrowe, K.L., 1999. Hormonal control of estrous cyclicity and attempted superovulation in wood bison (*Bison bison athabasca*). *Theriogenology* 52, 313-323.
- Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Bailey, J.L., 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74, 878-892.
- 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, 449-461.
- Ramachandran, R., Vinothkumar, A., Sankarganesh, D., Suriyakalaa, U., Aathmanathan, V.S., Kamalakkannan, S., Nithya, V., Angayarkanni, J., Archunan, G., Akbarsha, M.A., Achiraman, S., 2020. Detection of estrous biomarkers in the body exudates of Kangayam cattle (*Bos indicus*) from interplay of hormones and behavioral expressions. *Domest Anim Endocrinol* 72, 106392.
- Tanaka, Y., Sandoval, E.D.P., Duarte, J.M.B., 2019. Non-homogeneous distribution of steroids in fecal pellets: An example in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) with progesterone metabolites. *Gen Comp Endocrinol* 282, 113206.
- Vervaecke, H., Schwarzenberger, F., 2006. Endocrine and behavioral observations during transition of non-breeding into breeding season in female American bison (*Bison bison*). *Theriogenology* 66, 1107-1114.
- Wang, P., Chen, Q., Yuan, P., Lin, S., Chen, H., Li, R., Zhang, X., Zhuo, Y., Li, J., Che, L., Feng, B., Lin, Y., Xu, S., Wu, D., Fang, Z., 2022. Gut microbiota involved in desulfation of sulfated progesterone metabolites: A potential regulation pathway of maternal bile acid homeostasis during pregnancy. *Front Microbiol* 13, 1023623.
- Wang, P.H., Chen, Y.L., Wei, S.T., Wu, K., Lee, T.H., Wu, T.Y., Chiang, Y.R., 2020. Retroconversion of estrogens into androgens by bacteria via a cobalamin-mediated methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 1395-1403.
- Whitlock, B.K., Coffman, E.A., Coetzee, J.F., Daniel, J.A., 2012. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology* 78, 737-746.

Section expérimentale

Etude 3 :

**Diagnosing American Bison pregnancy during its two last trimesters:
comparison between rectal palpation associated with ultrasonography and
hormonal assays in serum or in feces**

<i>Animal Reproduction Science 272 (2025) 107660</i>
--

Vincent FRISSE, Goulven RIGAUX, Patrice DUFOUR, Flore BRUTINEL, Philippe BOSSAERT, Sophie EGYPTIEN, Olimpia BARBATO, Frédéric FARNIR, Caroline LE GOFF, Stéfan DELEUZE, Etienne CAVALIER, Jérôme PONTHER

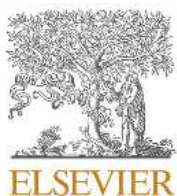
Préambule

Après avoir décrit les concentrations sériques des PAGs, de la P4, de l'E1 et de l'E1S dans la première étude et mis au point une méthode de dosage de la P4 et de l'E1S dans les matières fécales dans la deuxième étude, la troisième étude s'est focalisée sur la comparaison de la fiabilité diagnostique des dosages des marqueurs de gestation et du TRPUS.

Les animaux inclus étaient répartis comme suit : 40 femelles non gestantes, 3 en 1TP, 27 en 2TP, 15 en 3TP et 7 mâles. Pour chaque dosage sérique ou fécal envisagé comme un éventuel diagnostic de gestation, des courbes ROC ont permis de déterminer les valeurs seuils permettant de séparer les femelles gestantes des non gestantes. La possibilité de déterminer le trimestre de gestation sur base des dosages hormonaux dans les matrices étudiées a été investiguée de la même manière. Les Se, Sp, VPN et VPP des dosages hormonaux et des TRPUS ont ensuite été comparées tout en prenant en compte des considérations pratiques afin de déterminer les méthodes de diagnostic de gestation les plus appropriées à chaque situation.

Bien que la TRPUS nécessite une forte contention et des compétences en palpation, elle a été concluante dans 71% des cas, montrant une bonne sensibilité (97%) et une spécificité acceptable (83%). Les concentrations de PAGs, P4, E1S et E1 dans le sérum étaient plus élevées chez les femelles gestantes (P), avec des seuils donnant une spécificité et une sensibilité acceptables (sensibilité la plus faible pour l'E1 et l'E1S : 92% ; spécificité la plus faible pour la P4 : 93%). Dans les matières fécales, la P4 et l'E1S étaient plus élevés chez les femelles gestantes : le diagnostic de gestation à l'aide du dosage d'E1S dans les matières fécales a montré une sensibilité et une spécificité de 100%.

En conclusion, cette étude visait à proposer un outil de diagnostic de gestation sensible, spécifique et aisé chez le bison d'Amérique. Il s'est avéré que le dosage de l'E1S dans les matières fécales durant les deux derniers trimestres de gestation est sensible et spécifique. Le diagnostic de gestation à l'aide du TRPUS peut être utile dans les ranchs, mais nécessite une contention et une adaptation des compétences. Les dosages hormonaux sériques peuvent aider à évaluer la période de gestation, mais nécessitent également une contention.



Diagnosing american bison pregnancy during its two last trimesters: Comparison between rectal palpation associated with ultrasonography and hormonal assays in serum or in feces

Vincent Frisé^a, Goulven Rigaux^b, Patrice Dufour^c, Flore Brutinel^d,
Philippe Bossaert^a, Sophie Egyptien^d, Olimpia Barbato^e, Frédéric Farnir^f,
Caroline Le Goff^c, Stéfan Deleuze^d, Etienne Cavalier^c, Jérôme Ponthier^{d,*}

^a Production Animals Department, FARAH Sustainable Livestock Production, Liège University, Belgium

^b Pan Anima, Tournai, Belgium

^c Clinical Chemistry, University Hospital (CHU), Liège University, Belgium

^d Theriogenology unit, FARAH Comparative Veterinary Medicine, Liège University, Belgium

^e Veterinary Medicine Department, Perugia University, Perugia, Italy

^f Biostatistics and bioinformatics applied to Veterinary Sciences, FARAH Sustainable Livestock Production, Liège University, Belgium

Abstract

The study aimed to propose sensitive, specific and easy pregnancy diagnosis for American Bison. Trans-rectal Palpation and Ultrasonography (TRPUS), concentration of Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG), Progesterone (P4), Estrone (E1), Estrone-Sulfate (E1S) in serum and P4 and E1S in feces were compared. Immunoassay was used for PAG, whereas steroids were assayed using Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Pregnancy and its period were retrospectively assessed after calving. Animals included were distributed as follows: 40 were non-pregnant, 27 were in their second and 15 in their third trimester of gestation. Fisher's test was used to determine sensitivity and specificity of TRPUS. Thresholds leading to best sensitivities and specificities for hormonal assays were determined using Receiver Operating Characteristic Curves. Although TRPUS requires contention, palpation skills, it was conclusive in 70.63% of cases and good sensitivity (97.50%) and decent specificity (83.33%) were observed. Concentrations of PAG, P4, E1S and E1 in serum were higher in Pregnant animals (P), with thresholds giving decent specificity and sensitivity (lower sensitivity for E1 and E1S: 92.11%; lower specificity for P4: 93.48%). In feces, P4 and E1S were higher in P: pregnancy diagnosis using E1S assay in feces showed 100% of sensitivity and specificity. In conclusion, assaying E1S in feces during the two last trimesters of American Bisons pregnancy is a sensitive and specific gestation diagnosis. Pregnancy diagnosis using TRPUS can be useful in ranches but requires contention and skill adaptation. Serum hormonal assays can help evaluating the pregnancy period but also require contention.

1. Introduction

Although American Bison (*Bison bison bison* or *Bison bison athabasca*) were nearly extinct until recently, they are now re-colonizing their natural environment and bred in natural parks or for meat production. Easy and non-invasive pregnancy diagnosis technique is required to sort pregnant and non-pregnant females before culling or to assess fertility in wild groups. American Bison are however often extensively bred and simple manipulations like blood sampling or Trans-Rectal Palpation and Ultrasonography (TRPUS) are time-consuming, dangerous for animals and operators, because of bison's wild comportment (McCorkell et al., 2013b; Love et al., 2017), thus requiring heavy restraint methods associated with important workforce. Moreover, uterine body is a little bit longer and pelvis narrower compared to cows, making diagnosis by trans-rectal palpation more difficult (Haigh et al., 1991).

Pregnancy diagnosis using semi-quantitative BIO-PRYN Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) for Pregnancy-Specific Protein-B (PSPB), one of the Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) (Haigh et al., 1991) has recently been validated in Bison serum and showed good specificity and sensitivity, even in early gestation (Love et al., 2017), but the evolution of the PSPB concentration during pregnancy was not reported (Love et al., 2017). In a previous study (Frisee et al., 2022), we assayed PAG in American Bison using a dedicated Radio-Immuno Assay (RIA) and observed an increase of PAG after three months of pregnancy. For steroids, Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS/MS) has become the gold standard as it improves sensitivity, specificity and reproducibility (Conley, 2016; Conley and Ball, 2019). We previously validated Estrone (E1), Estrone-Sulfate (E1S) and Progesterone (P4) assays in serum of American Bison using LC-MS/MS (Dufour et al., 2021). In a previous study, E1, E1S and PAG were demonstrated as potential pregnancy markers whereas P4 was not (Frisee et al., 2022), but cut-off values, sensitivity and specificity of these assays used as potential pregnancy diagnosis were not reported.

To address the concerns about contention, animals and operators security while sampling blood in American Bison, urinary and fecal sexual steroids have been tested in early studies using immunoassays for total estrogens, with no information about the type of estrogen produced (Kirkpatrick et al., 1991; Kirkpatrick et al., 1992). Results observed were promising, but the small numbers of animals were all at the same gestational period (third month of pregnancy) (Kirkpatrick et al., 1991; Kirkpatrick et al., 1992), requiring new studies to use this methodology during the nine months pregnancy. In our previous report, fecal concentrations of P4 and E1S were assayed using a LC-MS/MS dedicated method (Dufour et al., 2024).

Despite the heterogeneity of steroids repartition in feces and the evolution of their concentrations during 20°C storage, a good correlation between serum and feces concentrations was observed for E1S, whereas a poor correlation was observed for P4 (Dufour et al., 2024). The use of these assays in feces for a pregnancy diagnosis still requires to determine cut-off values, sensitivity and specificity.

The present study aimed to compare physical diagnosis (TRPUS), hormonal assays of PAG, P4, E1 and E1S in serum and of P4 and E1S in feces to determine the most sensitive, specific and easy pregnancy diagnosis for American Bisons. The ability of the different methods to assess the trimester of pregnancy was also evaluated.

2. Material and Methods

2.1. Animals and sampling

In the Belgian Ardennes ($\pm 50^\circ\text{N}$), two ranches are extensively breeding wild American Bison (*Bison bison*) imported from Montana (USA) since 1998 and 2004, respectively. The first ranch herd is divided in two separate meadows of 19 and 21 ha, each welcoming two sexually mature American Bison bulls and respectively 25 and 26 sexually mature cows. In the second ranch, ten sexually mature American Bison cows are roaming freely with one sexually mature bull in a 15 ha meadow. In both ranches, animals are not used to human presence and to manipulations, but the whole herd is monitored every morning from a tractor or a quad-bike, to detect events as dystocia, retained placentas or abortion. Once a year, animals are gathered and immobilized for mandatory diseases screening in a specific handling/chute system. Between January and February 2019, and between February and March 2020, this opportunity was used to collect blood in dry-tubes by venipuncture under the tail of all matures cows. Blood samples were centrifuged at 20°C ($1000 \times g$) and stored frozen (-80°C) until assays. Feces ($\pm 50\text{mL}$) were also collected by rectal palpation before TRPUS and stored frozen (-20°C).

Calving days of the American Bison cows were recorded for the year following the sampling procedures. Fertilization day of cows that calved was retrospectively obtained by subtracting 276 days of the calving day (Kirkpatrick et al., 1992; Vervaecke and Schwarzenberger, 2006; Frisee et al., 2022). Gestation day on sampling day was then determined by subtracting the fertilization day from the sampling day. Other events, such as abortion, disease, culling or late birth (more than 276 days after sampling) were reported by the breeders during the following year. American Bison's samples were divided in four classes: Non-Pregnant, when no calving was observed within the next nine and a half months (NP), first trimester of pregnancy, from day one to day 92 (1TP), second trimester of pregnancy, from day 93 to day 183 (2TP), third trimester of pregnancy, from day 184 to the end (3TP).

2.2. Trans-rectal palpation and ultrasonography (TRPUS)

Trans-rectal palpation was performed before ultrasonography (US) using EBmax RKU10 with a 5Mhz multifrequency transrectal probe (Echomedic, Lahamaide, Belgium) by three operators that are skilled bovine practitioners: the total procedure was limited to three minutes but could be shortened when the animal was becoming violent. Positive pregnancy diagnosis was established when the uterus was enlarged at palpation and cotyledons or parts of the fetus were observed during US. If the uterus was small and there were no cotyledons or no liquid in the uterine lumen, the cow was categorized as non-pregnant. In the case of discordant

information after three minutes or when the animal was becoming violent, pregnancy diagnosis by TRPUS was considered as non-conclusive.

2.3. Assays in serum and in feces

Dedicated RIA previously described (Frisee et al., 2022) was used to assay PAG in serum using: the minimum detection limit (MDL), was 0.1ng/mL and the intra- and inter-assay coefficients were 2.9% and 7.3%, respectively. Assays of P4, E1 and E1S were performed in serum using the validated LC-MS/MS method described by our team (Dufour et al., 2021; Frisee et al., 2022). For P4, E1 and E1S, Lower Limit Of Quantification (LLOQ), defined as the lowest concentration in the validation standards that reported Relative Standard Deviation and Relative Bias lower than 15%, were established at respectively 0.1ng/mL, 2.0pg/mL and 0.5ng/mL (Dufour et al., 2021).

Assays of P4 and E1S were performed in feces using the pre-analytical method previously described and validated (Dufour et al., 2024). Hormones' concentrations were then determined using our LC-MS/MS validated method (Dufour et al., 2024) without replicate: the LLOQ of the method were set at 20pg/g and 4ng/g of matter for E1S and P4, respectively.

2.4. Statistics

Graphpad Prism was used (version 9.0 for Mac OSX, Graphpad Inc., San Diego, USA) and statistical significance was established at $p < 0.05$ for this double-blind prospective study. Normal distribution of values was tested using Kolmogorov-Smirnov test. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation or median and 25 and 75 quartiles if they are not normally distributed.

For TRPUS, Fisher exact test was used to determine significance of contingency table's distribution and subsequent sensitivity (Se), specificity (Sp) and Likelihood Ratio (LR) were determined. Unclear pregnancy diagnose were also studied by this way, assuming the equal chance of non-conclusive TRPUS to lead to a pregnancy or a non-pregnancy diagnosis as null hypothesis.

As hormonal concentrations in serum and in feces were not normally distributed, they were log-normalized, and, as Leven's test showed differences in observed variances of Pregnant (P) and NP groups for all hormonal assays, welch corrected t test was used. Receiver Operating Characteristic (ROC) (Detilleux et al., 1999; Ponthier et al., 2010) were then performed to determine the best threshold to discriminate P and NP animals for each hormone

assayed in serum or in feces. For each ROC analysis, Fisher's test was used to determine significance of contingency table and of the subsequents Se, Sp and LR. For serum assays of P4 and E1S, a combined model was created to determine the thresholds of these hormone to achieve best Se and Sp.

For P4 and E1S assays in feces, correlation between day of pregnancy and hormone concentration was tested using Spearman non-parametric test. To diagnose the trimester of pregnancy, welch corrected t test was performed on log-normalized data of 2 and 3TP for concentrations of E1 and E1S in serum and of P4 and E1S in feces. The ROC procedure was then used to determine the best threshold to discriminate 2 and 3TP using LR.

3. Results

3.1. General results

Among the 52 pregnancies observed in this study, three were in the 1TP group and were excluded from this study because of the low amount of data available in this period. Five pregnant animals at the sampling time aborted later and two were culled: as the calving days were unknown, the trimesters of pregnancy were impossible to determine, and these animals were excluded from the present study. Respectively, 27 and 15 observed pregnancies were in 2TP and 3TP. Forty American Bison cows were included in NP group.

3.2. Trans-rectal palpation and ultrasonography for pregnancy diagnosis in American Bison

According to the operators involved in the present study, TRPUS technique in American Bison did not really differs from domestic cows. The uterine body is a little bit longer and the bison pelvic floor is not horizontal, as it is observed in the cow, but presents an ascending slope parallel to the sacrum. Our observations on available anatomic pieces estimated angulation between ilium and pelvic floor of 155° versus 145° for cattle (See Figure 1). This conformation explains the narrower and longer pelvis of American Bison, followed by a pronounced angulation with the abdomen reported by the TRPUS operators of this study. Among the 82 American Bison presented for pregnancy diagnosis, TRPUS were not realized on one animal that was too stressed and violent, kicking through the specific handling/chute system. A conclusion about gestational status could be given in 70.73% of performed TRPUS, with a high Se (100%; see Table 1) and decent Sp (81.82%). Among the 24 remaining inconclusive cases, 16 turned out to be in the NP group. As these data did not differ from a random distribution, no deduction can be drawn from the cases of non-conclusive TRPUS, that are not clearly associated with NP animals. In these unclear cases, duration of the procedure and stress of the animal were the main limitations. These concerns also explain why TRPUS did not enable the operators to give a gestational age, as it would require increasing procedures duration.

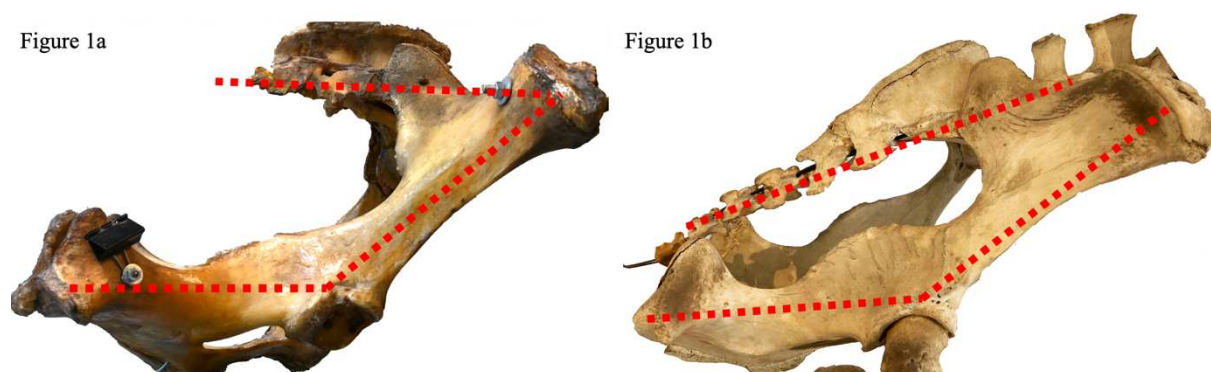


Figure 1: Pelvis anatomy of Bovine and American Bison cows. Figure 1a is a picture of a dairy cow pelvis. Figure 1b is a picture of an American Bison cow. Main lines of the pelvis are red dotted. Angle between pelvic floor and ilium is more closed in cattle (145°) than in American Bison cows (155°). Pictures credits: Vincent Frisée and Jérôme Ponthier.

3.3. Hormonal assays in serum and feces for pregnancy diagnosis in American Bison

In the serum, PAG, P4, E1 and E1S were all significantly different between NP and P animals. The thresholds with the higher LR determined by the ROC procedures were selected. Table 1 is summarizing these results. The lowest Se (92.11%) of the studied pregnancy diagnosis means using serum was observed for E1 and E1S assay in serum, whereas the lowest Sp (93.48%) was reached by P4 assay in serum. Using a combined model with P4 or E1S to diagnose pregnancy, Se and Sp reached 100% and 95.65%, respectively with combined threshold of P4 and E1S above 3.7ng/mL and 1.2ng/mL. Between 2 and 3TP, differences could be observed in E1 and E1S serum concentrations (respectively, $P=0.0401$ and $P=0.0004$). Use of ROC curve led to observe the best Se of 66.67% (95% interval: 41.72 - 84.82%) and Sp of 65.22% (95% interval: 44.89 - 81.19%) for E1 threshold at 30.80pg/mL, whereas these values were respectively 84.62% (95% interval: 57.77 - 97.27%) and 73.33% (95% interval: 48.05 - 89.10%) for E1S threshold at 5.55ng/mL.

Feces could easily be collected on animals, including the cow that did not tolerate TRPUS. Determination of P4 concentration in feces for pregnancy diagnosis in American Bison has decent Se and Sp, but clearly below those observed for E1S assay in feces (see Table 1). In our population, assay of E1S in feces showed perfect combined Se and Sp: E1S concentrations in feces of NP American Bison cows were all below the 20pg/g LLOQ value, whereas the minimal value observed on a pregnant cow (in 2TP, 146 days of pregnancy) was 57.96pg/g.

The concentration of P4 in feces was not correlated to the day of pregnancy (Figure 2), whereas E1S was moderately correlated (Spearman test values: $P < 0.0001$ and $r = 0.6748$; Figure 3). There was however no difference in E1S fecal concentrations between 2 and 3TP, meaning that it cannot be yet used to determine the trimester of pregnancy.

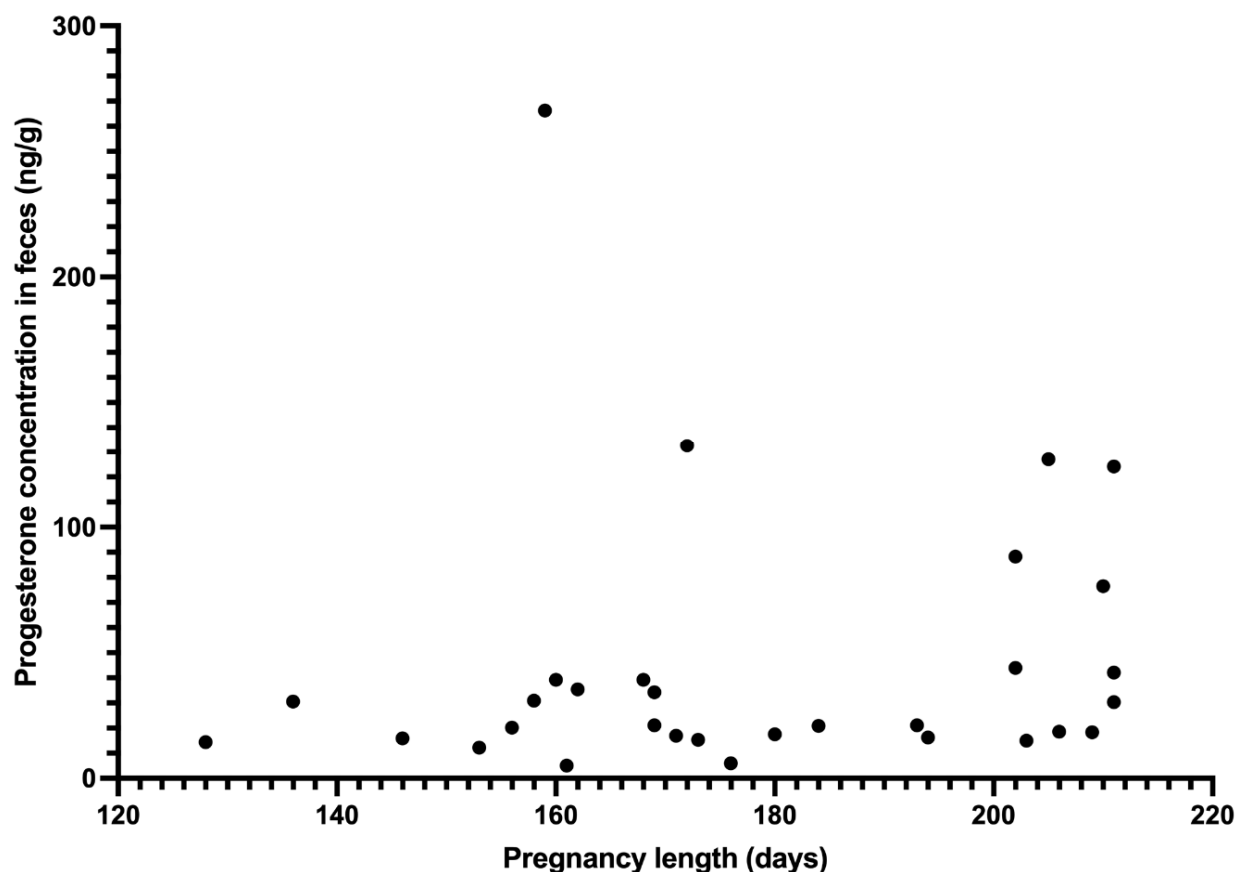


Figure 2: Evolution of Progesterone concentration (in ng/g of matter) in American Bison cows' feces during the end of pregnancy. Progesterone concentration in feces (in ng/g of matter) assayed by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry evolution during American Bison pregnancy in days. Each dot represents the progesterone concentration (ng/g) observed in a different pregnant American Bison cow for its day of pregnancy at sampling (Spearman test values: $P = 0.1413$; $r = 0.2703$).

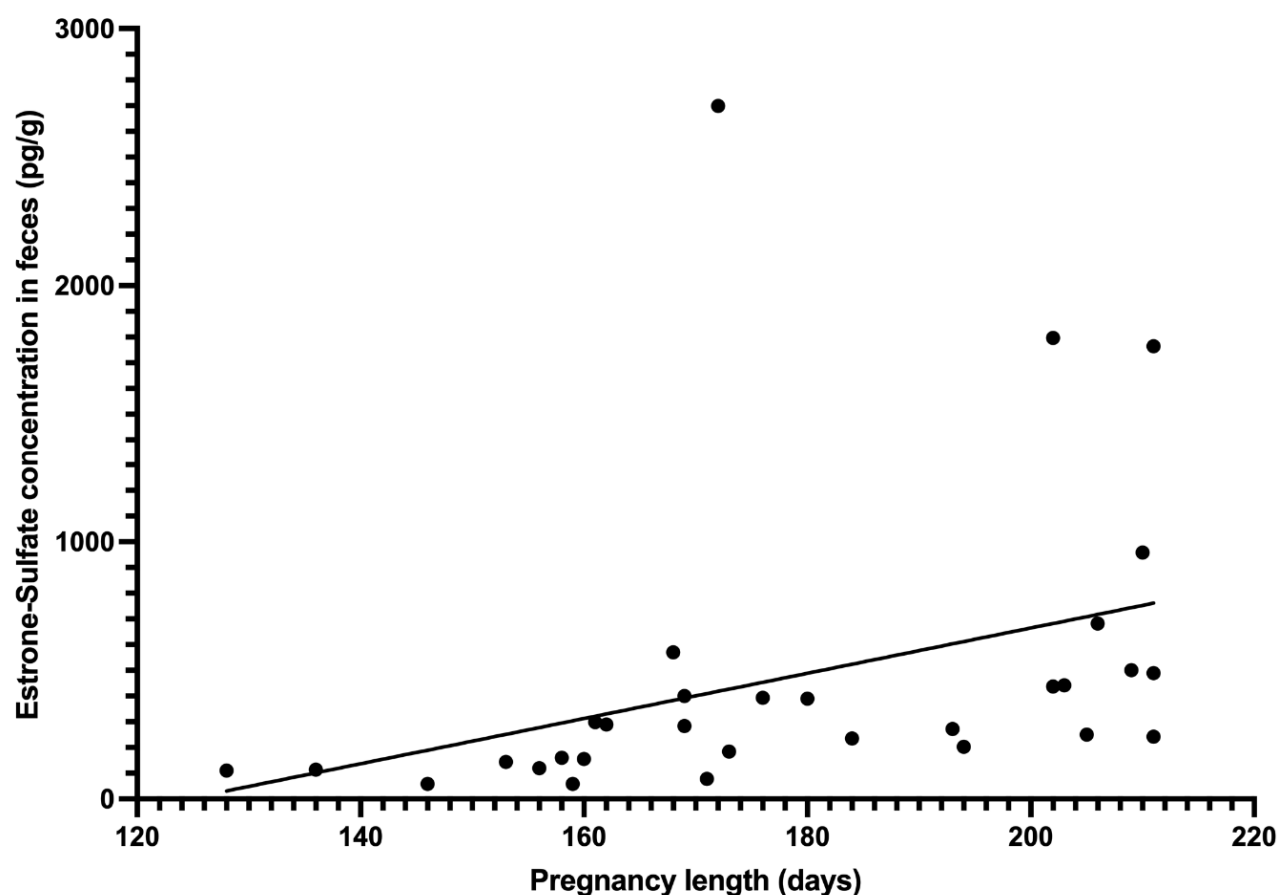


Figure 3: Evolution of Estrone-Sulfate concentration (in pg/g of matter) in American Bison cows' feces during the end of pregnancy. Estrone-Sulfate concentration in feces (in pg/g of matter) assayed by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry evolution during American Bison pregnancy in days. Each dot represents the progesterone concentration (ng/g) observed in a different pregnant American Bison cow for its day of pregnancy at sampling (Spearman test values: $P < 0.0001$; $r = 0.6748$).

Table 1: Comparison of the different diagnosis means evaluated

	P value	Threshold	Sensitivity (95% interval)	Specificity (95% interval)	Likelihood Ratio
TRPUS	<0.0001		100.00 % (89.57 to 100.00 %)	81.82 % (61.48 to 92.69 %)	5.50
Serum PAG	<0.0001	4.15 ng/mL	92.68 % (80.57 to 97.48 %)	97.62 % (87.68 to 99.88 %)	38.93
Serum P4	<0.0001	3.40 ng/mL	100.00 % (90.82 to 100.00 %)	93.48 % (82.50 to 97.76 %)	15.33
Serum E1	0.0003	3.90 pg/mL	92.11 % (79.20 to 97.28 %)	97.83 % (88.66 to 99.89 %)	42.37
Serum E1S	0.0007	0.55 ng/mL	92.11 % (79.20 to 97.28 %)	97.83 % (88.66 to 99.89 %)	42.37
Feces P4	0.0391	11.60 ng/g	93.55 % (79.28 to 98.85 %)	97.37 % (86.51 to 99.87 %)	35.55
Feces E1S	<0.0001	38.98 pg/g	100.00 % (88.97 to 100.00 %)	100.00 % (90.82 to 100.00 %)	Undetermined

TRPUS: Trans-Rectal Palpation and Ultra-Sonography; PAG: Pregnancy Associated Glycoproteins concentration; P4: Progesterone concentration; E1: Estrone concentration; E1S: Estrone-Sulfate Concentration

4. Discussion

To the best of our knowledge, this study gathers the highest number of American Bison cows (n=82) undergoing pregnancy diagnosis with physical and hormonal methods. A pregnancy diagnosis method for wild animals should be highly sensitive to avoid the risk of culling pregnant animals while maintaining a high specificity, but it also has to be easy to perform on field without risks for animals and operators. Pregnancy diagnosis by TRPUS was risky for operators and animals, requiring heavy restraint that can be stressful for American Bison (McCorkell et al., 2013a; McCorkell et al., 2013b), and conclusive in only $\approx 70\%$ of cases. When conclusive, TRPUS have a very high Se and a satisfying Sp. Differences in pelvis conformation between cattle and American Bison were observed by skilled bovine practitioners involved in this study: it was disruptive for the first TRPUS, but the operators rapidly adapted to this conformation. On the other hand, ultrasonographic pictures were not different, with cotyledons and fetus most like what is observed in cattle. Nevertheless, the bovine practitioners involved in this study were not able to give a gestational age to the fetus, partially because of the anatomical and developmental differences, but mainly due to the increased examination duration leading to risks for the animal and the operators.

Blood sampling also requires heavy contention, but it can be performed during the mandatory diseases screening (e.g.: brucellosis) and enables assay of PAG and steroids. In this study, assaying P4 in serum for pregnancy diagnosis showed a high Se and satisfying Sp. In our previous study describing P4 evolution during American Bison gestation (Frisee et al., 2022), its assay was unreliable to determine pregnancy period. A couple of factors may explain the absence of evolution during pregnancy and tune down our Se and Sp results. Our sampling sessions were performed in January or February, when most of American Bison cows were in anestrus (Kirkpatrick et al., 1992; Vervaecke and Schwarzenberger, 2006; Frisee et al., 2022), whereas diestrus animals could be more frequently present during other seasons, leading to confusions with pregnant ones. On the other hand, stress is known to induce P4 production in bovine and could also influence these results (Whitlock et al., 2012).

Thus, PAG, that are more specific pregnancy markers were assayed in serum, leading to a satisfying Se, in the range of what has been reported with BIO-PRYN ELISA for PSPB in late American Bison pregnancy, and with a high Sp, but slightly below what has been observed in this previous report (Love et al., 2017). In our study, three pregnant cows at approximately 6 months of pregnancy had PAG serum concentrations below the threshold fixed by the ROC procedures, leading to lower our Se. The low Sp observed in this study and in the report using BIO-PRYN ELISA for PSPB (Love et al., 2017) could be explained by the sampling of

previously pregnant animals, as PAG could return to basal level up to one month, as it has been observed in water buffaloes (Barbato et al., 2017). Assay of PAG in serum is unsuitable in American Bison to determine if animals were in 2 or 3TP, due to constant PAG production in late pregnancy (Frisee et al., 2022), also observed in buffaloes (Barbato et al., 2017), unlike what is observed in cattle (Shahin et al., 2014).

On the other hand, the increase in E1S serum concentration during American Bison pregnancy is consistent with previous reports in cattle, goats and buffaloes (Hung and Prakash, 1990; Isobe et al., 2003; Singh et al., 2019), and is of interest to determine the gestational period when American Bison cows lose their seasonality in captive conditions (Frisee et al., 2022). In our previous study, E1 and E1S assay in serum both showed differences between 2 and 3TP (Frisee et al., 2022), and the ROC procedure performed in the present study led to observe acceptable Se and Sp to determine trimester of pregnancy with E1S, but not with E1. As an evidence, diagnosing American Bison pregnancy using E1 and E1S assay in serum led to satisfying Se and excellent Sp, that can be increased when used together with P4, similar to results of previous study in American Bison late pregnancy using BIO-PRYN ELISA for PSPB (Love et al., 2017). The placental production of E1S has long been described in ruminants (Tsang, 1974; Hung and Prakash, 1990; Isobe et al., 2003; Singh et al., 2019) and explains the interest for this hormone to detect gestation, as it is pregnancy specific and quickly decreases after the calving (Shah et al., 2007). Serum sampling on wild or semi-wild animals remains however a challenge and alternative methods were investigated.

Collection of American Bison urine and feces for pregnancy diagnosis have been described in early reports (Kirkpatrick et al., 1991; Kirkpatrick et al., 1992). For our study, feces were preferred as they seem to be easier to collect on animals or to identify in pasture than urine. With a methodology respecting our previous concerns about homogeneity and stability of steroids in American Bison feces (Dufour et al., 2024), P4 and E1S were assayed in feces and evaluated as a potential pregnancy diagnosis. Although P4 concentration in feces showed a low correlation with its serum concentrations in our validation study of this assay (Dufour et al., 2024), use of P4 assay in feces as a pregnancy diagnosis for American Bison led to satisfying Se and high Sp. Progesterone is known to be modified in pregnant cows after nutritional challenge (Shemesh, 1990; Izhar et al., 1992; Shemesh et al., 1994) and stress can increase its adrenal production, even in bulls (Hollenstein et al., 2006). This could partially explain the observed absence of correlation between P4 concentration in feces and the day of pregnancy. Moreover, some pregnant American Bisons cows could be confused with ones in diestrus using single P4 concentration assay in feces, (Frisee et al., 2022). On the other hand,

chronically stressed American Bison bulls could be considered as pregnant animals, as P4 and its metabolites concentrations in captured wild elks' feces were higher than in non-pregnant animals (Watson et al., 2023). On the contrary, assay of E1S in feces of pregnant and non-pregnant cows included in this study led to statistically perfect pregnancy diagnosis, as suggested in preliminary studies (Kirkpatrick et al., 1992). This method has higher Se and Sp than all others gestation detection means proposed in this study, but also than BIO-PRYN ELISA for PSPB assay in serum of American Bison in late pregnancy (Love et al., 2017). Some limitations have to be mentioned regarding our previous study validating this assay in feces (Dufour et al., 2024). In the present report, two pregnant animals showing feces E1S concentration below the LLOQ were excluded: one cow in 1TP and the other one with unknown gestational period, as she aborted after sampling. Using these two cows in the current set of data would lead to slightly lowered sensitivity (97.06%), but specificity would remain perfect, with best performances than those observed with previously described assays (Love et al., 2017). An E1S concentration in feces below LLOQ can thus be interpreted in different ways: NP animal, American Bison cow in early pregnancy or male. To resolve these unknowns, E1S concentration in feces concentration should be investigated in 1TP to determine the onset of its excretion and after the calving to determine time required to return below the LLOQ. Moreover, assay of androgens in American Bison feces should be developed using LC-MS/MS to identify bulls. When compared to E1S assay in serum, the only drawback with its assay in feces for American Bison pregnancy diagnosis would be that it cannot determine the trimester of pregnancy. Metabolism of estrogens inside the feces involving microbiological flora could explain the unparallel evolution of E1S in serum and feces (Dufour et al., 2024). A moderate correlation between E1S concentration in feces and day of pregnancy was however observed in the present data. It can thus be assumed that increasing the number of sampled feces of pregnant American Bison cows assayed for E1S in feces could help addressing this concern.

A pregnancy diagnosis available on feces is an opportunity for fertility investigation in wild herd of American Bison. Feces collection can be performed without any contention, just observing the herd and waiting for it to move, before safely accessing the samples. Moreover, E1S assay for pregnancy diagnosis in American Bison feces can be linked to fecal DNA analysis (Forgacs et al., 2016; Forgacs et al., 2019) to identify the pregnant or non-pregnant animals and potentially sort them before exportation or culling. Developing multiplex LC-MS/MS assays including P4, E1S, E1, estradiol, testosterone and corticosteroids in feces could also lead to a better comprehension of American Bison cyclicity, pregnancy and levels of stress. This methodology could also be extrapolated and validated for other wild ruminants in the future.

The first limitation is that NP cows could be pregnant at the time of sampling and abortion could occur later, without being observed by the owners. This concern seems to be unlikely, as owners observed five abortions, what is consistent with a normal abortion rate and confirms their ability to record such events. Moreover, the data of TRPUS closely match with the hormonal assays results. The other limitation is the low number of American Bison cows in early pregnancy observed between the end of January and in the beginning of February, despite seasonality loss was observed in Belgium in our previous paper (Frisee et al., 2022), that led to exclude cows in 1TP from this study. An increase of total estrogens concentration in feces was observed as early as three months by the preliminary studies about pregnant American Bison cows (Kirkpatrick et al., 1992). Previous reports using BIO-PRYN ELISA for PSPB also showed satisfying sensitivity and excellent specificity at two months of pregnancy (Love et al., 2017). Further studies should be designed to complete the description of American Bison early pregnancy's endocrinology. Moreover, these studies could also lead to determine what is the earlier and easier diagnosis available in American Bison between TRPUS, serum or feces assays.

5. Conclusion

For wild American Bison, assaying E1S in feces is a nearly perfect pregnancy diagnosis during its last six months and could be linked to individual recognition methods using PCR methods available on feces. Increasing the number of sampled feces in future studies could improve the ability to determine the pregnancy period. On the other hand, in safari parks or in ranches breeding American Bison where the herd is gathered for sanitary screening, TRPUS are still of interest as it is nearly costless and gives satisfying results when it leads to a conclusion. The TRPUS method remains however dangerous for animals and operators and requires to adapt their skills as a heavy restraint. When TRPUS are not feasible or not conclusive, blood collection can help to diagnose the pregnancy, and to estimate gestational age, in case of seasonality loss. Future experiments should focus on the first trimester of American Bison pregnancy to understand its physiology, but also to determine the onsets of hormone production in order to describe early and easy pregnancy diagnosis methods. Such a methodology using matrices easy to collect could also be of interest for gestation detection in other wild ruminants.

Acknowledgements :

Authors would like to thank Candice Leroy, Laurent Naveau and all the team of the Bison Ranch, located in Orchimont, Vresse Sur Semois, Belgium and M. Jérémie Van Ael from Lignières, Belgium. Authors also would like to thank Prof. J.-F. Beckers, Dr. Marta David, Dr. Coralie Lagamme and Dr. Margot Stipulanti for their help at different steps of the protocol. Authors would also like to thank Dr. Anne-Françoise Rousseau for her careful reviewing of the paper.

6. Bibliography:

Barbato, O., Menchetti, L., Sousa, N.M., Malfatti, A., Brecchia, G., Canali, C., Beckers, J.F., Barile, V.L., 2017. Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) concentrations in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) during gestation and the postpartum period. *Theriogenology* 97, 73-77.

Conley, A.J., 2016. Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. *Theriogenology* 86, 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, R197-R208.

Detilleux, J., Arendt, J., Lomba, F., Leroy, P., 1999. Methods for estimating areas under receiver-operating characteristic curves: illustration with somatic-cell scores in subclinical intramammary infections. *Prev Vet Med* 41, 75-88.

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. *Res Vet Sci* 136, 343-350.

Dufour, P., Frisee, V., Rigaux, G., Brutinel, F., Egyptien, S., Bossaert, P., Deleersnyder, J., Deleuze, S., Peeters, S., Le Goff, C., Ponthier, J., Cavalier, E., 2024. Analysis of progesterone and estrone-sulfate in feces of American Bison using liquid chromatography coupled to mass spectrometry: Technical validation and correlation with blood levels. *Domest Anim Endocrinol* 86, 106819.

Forgacs, D., Wallen, R.L., Boedeker, A.L., Derr, J.N., 2019. Evaluation of fecal samples as a valid source of DNA by comparing paired blood and fecal samples from American bison (*Bison bison*). *BMC Genet* 20, 22.

Forgacs, D., Wallen, R.L., Dobson, L.K., Derr, J.N., 2016. Mitochondrial Genome Analysis Reveals Historical Lineages in Yellowstone Bison. *PLoS One* 11, e0166081.

Frisee, V., Rigaux, G., Dufour, P., Barbato, O., Brutinel, F., Egyptien, S., Bossaert, P., Deleuze, S., Cavalier, E., Ponthier, J., 2022. American Bison (*Bison bison*) reproductive endocrinology: serum Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG), Progesterone, Estrone and Estrone-Sulfate in non pregnant animals and during gestation. *Domest Anim Endocrinol* 78, 106684.

Haigh, J.C., Gates, C., Ruder, A., Sasser, R., 1991. Diagnosis of pregnancy in wood bison using a bovine assay for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology* 36, 749-754.

Hollenstein, K., Janett, F., Bleul, U., Hassig, M., Kahn, W., Thun, R., 2006. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress. *Anim Reprod Sci* 93, 292-302.

Hung, N.N., Prakash, B.S., 1990. Influence of gestation on blood plasma concentrations of oestrone and oestrone sulphate in Karan Swiss cows and Murrah buffaloes. *Br Vet J* 146, 449-456.

Isobe, N., Nakao, T., Uehara, O., Yamashiro, H., Kubota, H., 2003. Plasma concentration of estrone sulfate during pregnancy in different breeds of Japanese beef cattle. *J Reprod Dev* 49, 369-374.

Izhar, M., Pasmanik, M., Shemesh, M., 1992. Bovine placental progesterone synthesis: comparison of first and second trimesters of gestation. *Biol Reprod* 46, 846-852.

Kirkpatrick, J.F., Bancroft, K., Kincy, V., 1992. Pregnancy and ovulation detection in bison (*Bison bison*) assessed by means of urinary and fecal steroids. *J Wildl Dis* 28, 590-597.

Kirkpatrick, J.F., Kincy, V., Bancroft, K., Shideler, S.E., Lasley, B.L., 1991. Oestrous cycle of the North American bison (*Bison bison*) characterized by urinary pregnanediol-3-glucuronide. *J Reprod Fertil* 93, 541-547.

Love, D.M., Mefford, M.T., Ramer, J.C., 2017. Validation of the BioPRYN enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pregnancy-specific protein-B (PSPB) and diagnosis of pregnancy in American bison (*Bison bison*). *Reprod Domest Anim* 52, 791-797.

McCorkell, R., Wynne-Edwards, K., Galbraith, J., Schaefer, A., Caulkett, N., Boysen, S., Pajor, E., of, U.C., 2013a. Transport versus on-farm slaughter of bison: physiological stress, animal welfare, and avoidable trim losses. *Can Vet J* 54, 769-774.

McCorkell, R.B., Woodbury, M.R., Adams, G.P., 2013b. Serial ovarian ultrasonography in wild-caught wood bison (*Bison bison athabasca*). *Theriogenology* 80, 552-556.

Ponthier, J., Franck, T., Detilleux, J., Mottart, E., Serteyn, D., Deleuze, S., 2010. Association between myeloperoxidase concentration in equine frozen semen and post-thawing parameters. *Reprod Domest Anim* 45, 811-816.

Shah, K.D., Nakao, T., Kubota, H., Maeda, T., 2007. Peripartum changes in plasma estrone sulfate and estradiol-17beta profiles associated with and without the retention of fetal membranes in holstein-friesian cattle. *J Reprod Dev* 53, 279-288.

Shahin, M., Friedrich, M., Gauly, M., Holtz, W., 2014. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) profile of Holstein-Friesian cows as compared to dual-purpose and beef cows. *Reprod Domest Anim* 49, 618-620.

Shemesh, M., 1990. Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review. *Reprod Fertil Dev* 2, 129-135.

Shemesh, M., Harel-Markowitz, E., Gurevich, M., Shore, L.S., 1994. Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells. *Biol Reprod* 51, 146-151.

Singh, S.P., Ramachandran, N., Sharma, N., Goel, A.K., Gururaj, K., Kharche, S.D., 2019. Temporal changes in plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein, progesterone and estrone sulfate associated with fetal number during early- and mid-pregnancy in goats. *Anim Reprod Sci* 205, 115-125.

Tsang, C.P., 1974. Changes in plasma levels of estrone sulfate and estrone in the pregnant ewe around parturition. *Steroids* 23, 855-868.

Vervaecke, H., Schwarzenberger, F., 2006. Endocrine and behavioral observations during transition of non-breeding into breeding season in female American bison (*Bison bison*). *Theriogenology* 66, 1107-1114.

Watson, E.M., Kurth, K.A., Metts, D.L., Moorey, S.E., Miller, B.F., Gerhold, R.W., Muller, L.I., 2023. Evaluating the Efficacy of Noninvasive Fecal Sampling for Pregnancy Detection in Elk (*Cervus Canadensis*). *J Wildl Dis* 59, 61-70.

Whitlock, B.K., Coffman, E.A., Coetzee, J.F., Daniel, J.A., 2012. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology* 78, 737-746

Section expérimentale

Tableaux des données

Les tableaux IX, X et XI, présentés ci-dessous, regroupent les données individuelles brutes pour chaque animal : date de prélèvement, identification anonymisée de l'animal, élevage d'origine, résultat de la palpation rectale, statut définitif de gestation, date de vêlage, et résultats des différents tests. Les animaux prélevés deux années consécutives portent la même identification, celle de 2020 est cependant suivie d'un « ' » afin de distinguer les résultats. Pour les PAGs, la LMD a été définie à 0,1 ng/mL. Pour la P4, l'E1 et l'E1S dans le sérum, les LLOQ respectives ont été définies à 0,1 ng/mL, 2 pg/mL et 0,5 ng/mL. Dans les matières fécales, la LLOQ de la P4 et de l'E1S ont été définies respectivement à 4 ng/g et 20 pg/g, (comme défini page 62). Lorsque les résultats des dosages sont inférieurs à la LLOQ, la valeur de la LLOQ a été renseignée et écrite en italique. Les animaux ayant été exclus des études sont surlignés en gris dans les tableaux. Lorsque le résultat est indiqué en Non Déterminé (ND), cela signifie que l'analyse n'a pas pu être réalisée du fait de l'absence d'échantillon ou d'un volume d'échantillon insuffisant.

Tableau IX : Résultats des dosages pour les mâles

Jour	Animal ID	Élevage	Date Vel	Sérum				Matières fécales	
				[PAG]	[P4]	[E1S]	[E1]	[E1S] MF	[P4] MF
				ng/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml	pg/g	ng/g
12-01-19	67	1	Mâle	0,1	0,2	0,5	2,0	ND	ND
15-02-20	68	1	Mâle	0,3	ND	ND	ND	20	4
16-02-20	69	1	Mâle	ND	0,3	0,5	2,0	ND	ND
07-03-20	70	2	Mâle	ND	2,5	0,5	2,0	20	5,92861564
07-03-20	71	2	Mâle	ND	1,4	0,5	2,0	ND	ND
07-03-20	72	2	Mâle	ND	1,2	0,5	2,0	20	4
07-03-20	73	2	Mâle	ND	1,7	0,5	2,0	20	5,83549784
Moyenne				0,2	1,2	0,5	2,0	20,0	4,9
Déviation standard				± 0,1	± 0,8	± 0,0	± 0,0	± 0,0	± 0,9

TRPUS = palpation transrectale et échographie ; PAG : glycoprotéines associées à la gestation ; P4 = progestérone ; E1 : œstrone ; E1S : sulfate d'œstrone
 ND : Non déterminé ; Si ≤ LMD (PAG) ou LLOQ (P4, E1, E1S), les résultats sont en italique. Les animaux reprélevés en 2020 ont ' derrière le numéro de 2019.

Tableau X : Résultats des dosages pour les femelles gestantes – Partie 1

Jour	Animal ID	Elevage	TRPUS	Date Vel	Durée Gest	Trimestre	Sérum				Matières fécales	
							[PAG]	[P4]	[E1S]	[E1]	[E1S] MF	[P4] MF
							ng/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml	pg/g	ng/g
12-01-19	13	1	Gestante	14-04-19	184	3	32,5	16,6	3,6	13,0	235,42	20,81
12-01-19	61	1	Gestante	27-04-19	171	2	16,4	14,5	2,1	28,3	ND	ND
12-01-19	60	1	Gestante	7-05-19	161	2	18,9	11,4	3,5	56,5	ND	ND
12-01-19	16	1	Gestante	12-05-19	156	2	16,1	5,0	1,9	19,6	119,61	20,15
12-01-19	1	1	Gestante	15-05-19	153	2	4,7	7,9	0,5	2,0	ND	ND
12-01-19	22	1	Gestante	15-05-19	153	2	16,1	8,4	2,9	62,2	143,61	12,19
12-01-19	8	1	Gestante	22-05-19	146	2	17,2	11,1	2,5	10,8	57,96	15,90
12-01-19	9	1	Gestante	1-06-19	136	2	23,6	10,8	2,4	28,9	114,28	30,48
13-01-19	56	1	Gestante	15-04-19	184	3	0,1	5,1	0,5	2,0	ND	ND
13-01-19	12	1	Gestante	17-04-19	182	2	0,2	ND	ND	ND	ND	ND
13-01-19	28	1	Gestante	18-04-19	181	2	17,9	7,1	5,3	15,9	ND	ND
13-01-19	11	1	Gestante	20-04-19	179	2	0,2	4,6	0,5	2,0	ND	ND
13-01-19	30	1	Gestante	21-04-19	178	2	20,4	5,1	7,2	33,6	ND	ND
13-01-19	59	1	Gestante	30-04-19	169	2	22,3	3,6	6,5	18,5	ND	ND
13-01-19	2	1	Gestante	13-05-19	156	2	15,4	3,6	3,6	21,3	ND	ND
13-01-19	5	1	Gestante	21-08-19	56	1	0,2	ND	ND	ND	ND	ND
13-01-19	54	1	Gestante	21-09-19	25	1	0,1	0,6	0,5	2,0	ND	ND
15-02-20	10'	1	Inconnu	16-04-20	215	3	28,1	10,0	3,7	25,1	ND	ND
15-02-20	13'	1	Gestante	20-04-20	211	3	28,1	15,5	7,8	24,9	489,28	42,02
15-02-20	29	1	Inconnu	20-04-20	211	3	12,9	10,1	18,5	79,9	1764,82	30,35
15-02-20	57'	1	Inconnu	20-04-20	211	3	23,7	15,7	6,8	32,7	242,12	124,11
15-02-20	48	1	Gestante	21-04-20	210	3	12	11,6	13,6	54,5	958,71	76,52
15-02-20	59'	1	Inconnu	22-04-20	209	3	13,6	6,9	10,1	110,5	500,83	18,24
15-02-20	52	1	Inconnu	25-04-20	206	3	27,6	11,3	11,1	83,4	682,55	18,51
15-02-20	44	1	Gestante	26-04-20	205	3	19,9	12,2	4,8	22,9	250,01	127,04

TRPUS = palpation transrectale et échographie ; PAG : glycoprotéines associées à la gestation ; P4 = progestérone ; E1 : œstrone ; E1S : sulfate d'œstrone

ND : Non déterminé ; Si ≤ LMD (PAG) ou LLOQ (P4, E1, E1S), les résultats sont en italique. Les animaux représentés en 2020 ont ' derrière le numéro de 2019.

Tableau X : Résultats des dosages pour les femelles gestantes – Partie 2

Jour	Animal ID	Elevage	TRPUS	Date Vel	Durée G	Trimestre	Sérum				Matières fécales	
							[PAG]	[P4]	[E1S]	[E1]	[E1S] MF	[P4] MF
							ng/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml	pg/g	ng/g
15-02-20	38	1	Gestante	29-04-20	202	3	18,6	7,4	8,2	41,2	1796,59	43,90
15-02-20	51	1	Gestante	8-05-20	193	3	28,5	8,0	5,8	40,0	272,02	21,03
15-02-20	16'	1	Gestante	21-05-20	180	2	22,5	11,6	5,3	35,3	390,10	17,49
15-02-20	22'	1	Gestante	25-05-20	176	2	16,7	6,9	7,2	69,5	393,46	5,91
15-02-20	39	1	Non réalisé	28-05-20	173	2	19,33	6,8	3,0	6,0	183,68	15,34
15-02-20	30'	1	Inconnu	29-05-20	172	2	15,4	ND	ND	ND	2698,81	132,52
15-02-20	49	1	Gestante	30-05-20	171	2	12,2	ND	ND	ND	77,67	16,94
15-02-20	46	1	Gestante	1-06-20	169	2	18,6	ND	ND	ND	400,46	34,18
15-02-20	60'	1	Gestante	12-07-20	128	2	10,6	12,2	1,5	52,4	110,05	14,41
15-02-20	11'	1	Inconnu	15-09-20	63	1	0,1	3,8	0,5	2,0	20,00	23,52
16-02-20	57	1	Inconnu	29-04-20	203	3	12,7	9,0	11,4	48,3	441,77	14,90
16-02-20	37	1	Inconnu	30-04-20	202	3	15,3	16,9	9,3	97,6	437,73	88,30
16-02-20	63'	1	Gestante	08-05-20	194	3	28,5	11,8	8,3	65,0	203,13	16,22
16-02-20	33'	1	Gestante	02-06-20	169	2	23,1	6,4	6,9	44,4	283,18	21,12
16-02-20	58	1	Gestante	03-06-20	168	2	25,2	12,4	6,2	25,5	569,82	39,16
07-03-20	20	2	Gestante	29-06-20	162	2	20,4	15,2	3,8	26,4	289,91	35,39
07-03-20	34	2	Gestante	30-06-20	161	2	15,9	9,6	5,2	22,0	298,04	5,03
07-03-20	6	2	Gestante	1-07-20	160	2	ND	9,5	1,3	8,5	155,55	39,22
07-03-20	27	2	Gestante	2-07-20	159	2	12,9	9,0	0,6	4,9	58,54	266,24
07-03-20	19	2	Gestante	3-07-20	158	2	13,8	21,9	6,6	71,5	159,95	30,85
12-01-19	10	1	Gestante	Avortement	0	0	25,8	14,9	3,3	23,7	104,24	17,98
13-01-19	33	1	Gestante	Avortement	0	0	34,9	5,6	5,9	44,7	ND	ND
13-01-19	66	1	Gestante	Avortement	0	0	24,7	14,8	1,1	3,5	ND	ND
13-01-19	26	1	Gestante	Réforme	0	0	35,1	4,3	7,4	13,0	ND	ND
13-01-19	63	1	Gestante	Réforme	0	0	34,9	8,2	2,3	12,8	ND	ND
15-02-20	9'	1	Gestante	Avortement	0	0	26,1	7,1	5,1	33,9	218,33	24,45
15-02-20	54'	1	Non Gestante	Avortement	0	0	5	10,9	0,5	6,0	20,00	17,24
Moyenne							17,7 ± 9,4	9,6 ± 4,3	5,0 ± 3,8	32,9 ± 26,6	423,6 ± 557,8	42,2 ± 50,5
Déviation standard												

TRPUS = palpation transrectale et échographie ; PAG : glycoprotéines associées à la gestation ; P4 = progestérone ; E1 : œstrone ; E1S : sulfate d'œstrone
 ND : Non déterminé ; Si ≤ LMD (PAG) ou LLOQ (P4, E1, E1S), les résultats sont en italique. Les animaux représentés en 2020 ont ' derrière le numéro de 2019.

Tableau XI : Résultats des dosages pour les femelles non gestantes – Partie 1

Jour	Animal ID	Elevage	TRPUS	Date Vel	Sérum				Matières fécales	
					[PAG]	[P4]	[E1S]	[E1]	[E1S] MF	[P4] MF
					ng/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml	Pg/g	ng/g
12-01-19	14	1	Non gestante	Non gestante	0,2	0,4	0,5	2,0	ND	ND
12-01-19	17	1	Non gestante	Non gestante	0,1	0,6	0,5	2,0	20,00	6,33
13-01-19	3	1	Non gestante	Non gestante	0,1	5,5	0,5	2,0	20,00	27,85
13-01-19	31	1	Gestante	Non gestante	0,1	2,6	0,5	2,9	20,00	4,00
13-01-19	57	1	Non gestante	Non gestante	0,3	3,2	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	5'	1	Non gestante	Non gestante	0,2	2,5	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	7	1	Gestante	Non gestante	0,1	0,2	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	14'	1	Non gestante	Non gestante	0,1	1,4	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	15'	1	Inconnu	Non gestante	0,1	12,0	0,5	2,0	20,00	11,01
15-02-20	32'	1	Non gestante	Non gestante	0,1	0,4	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	36'	1	Inconnu	Non gestante	0,1	1,3	0,5	2,0	20,00	7,66
15-02-20	40	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,9	0,5	2,0	20,00	6,17
15-02-20	41	1	Gestante	Non gestante	0,3	1,4	0,5	2,0	20,00	7,62
15-02-20	42	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,1	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	45	1	Inconnu	Non gestante	3,6	3,7	1,2	18,2	ND	ND
15-02-20	61'	1	Non gestante	Non gestante	0,1	0,9	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	62'	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,2	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	64'	1	Gestante	Non gestante	0,3	0,4	0,5	2,0	20,00	4,00
15-02-20	65'	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,5	0,5	2,0	20,00	4,64
16-02-20	12'	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,9	0,5	2,0	20,00	7,25
16-02-20	18	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,6	0,5	2,0	20,00	4,00
16-02-20	28'	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,5	0,5	2,0	20,00	4,00
16-02-20	43	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,2	0,5	2,0	20,00	4,00
16-02-20	50	1	Inconnu	Non gestante	0,1	1,8	0,5	2,0	20,00	4,00
16-02-20	53	1	Inconnu	Non gestante	0,1	0,3	0,5	2,0	20,00	4,00
16-02-20	56'	1	Inconnu	Non gestante	0,1	2,5	0,5	2,0	20,00	4,00

TRPUS = palpation transrectale et échographie ; PAG : glycoprotéines associées à la gestation ; P4 = progestérone ; E1 : œstrone ; E1S : sulfiate d'œstrone
 ND : Non déterminé ; Si ≤ LMD (PAG) ou LLOQ (P4, E1, E1S), les résultats sont en italique. Les animaux représentés en 2020 ont derrière le numéro de 2019.

Tableau XI : Résultats des dosages pour les femelles non gestantes – Partie 2

Jour	Animal ID	Elevage	TRPUS	Date Ve	Sérum				Matières fécales	
					[PAG]	[P4]	[E1S]	[E1]	[E1S] MF	[P4] MF
					ng/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml	pg/g	ng/g
16-02-20	66'	1	Inconnu	Non Gestante	0,2	0,1	0,5	2,0	ND	ND
07-03-20	21	2	Non Gestante	Non Gestante	0,1	1,4	0,5	2,0	20,00	4,00
07-03-20	23	2	Non Gestante	Non Gestante	0,3	0,3	0,5	2,0	20,00	4,93
07-03-20	24	2	Non Gestante	Non Gestante	0,2	1,3	0,5	2,0	20,00	4,00
07-03-20	25	2	Inconnu	Non Gestante	0,1	0,7	0,5	2,0	20,00	4,26
07-03-20	35	2	Non Gestante	Non Gestante	0,1	1,2	0,5	2,0	20,00	8,32
12-01-19	15	1	Non Gestante	25-10-19	0,2	0,3	0,5	2,0	20,00	4,00
12-01-19	62	1	Non Gestante	28-10-19	0,1	0,2	0,5	2,0	20,00	4,00
12-01-19	32	1	Non Gestante	8-11-19	16,5	0,9	0,5	2,0	ND	ND
12-01-19	36	1	Non Gestante	12-11-19	0,1	0,3	0,5	2,0	ND	ND
12-01-19	64	1	Non Gestante	12-11-19	0,1	0,9	0,0	2,0	20,00	4,00
12-01-19	65	1	Non Gestante	16-11-19	0,1	0,3	0,5	2,0	20,00	4,00
12-01-19	55	1	Non Gestante	Réformée	0,2	0,1	0,5	2,0	ND	ND
12-01-19	4	1	Non Gestante	Réformée	0,2	0,7	0,5	2,0	20,00	4,00
Moyenne					0,6	1,3	0,5	2,4	20,0	5,5
					± 2,6	± 2,0	± 0,1	± 2,5	± 0,0	± 0,9

Déviation standard

TRPUS = palpation transrectale et échographie ; PAG : glycoprotéines associées à la gestation ; P4 = progestérone ; E1 : œstrone ; E1S : sulfate d'œstrone
 ND : Non déterminé ; Si $\leq$ LMD (PAG) ou LLOQ (P4, E1, E1S), les résultats sont en italique. Les animaux représentés en 2020 ont ' derrière le numéro de 2019.

Discussion - Perspectives

Les données antérieures de la littérature décrivant la gestation du bison d'Amérique (AmB) étaient parcellaires, car elles n'incluaient que de petits nombres d'animaux testés à certains moments ponctuels de la gestation. À notre connaissance, notre étude a inclus le plus grand nombre de bisons américains sur lesquels des échantillons sanguins et fécaux ont pu être prélevés simultanément pour comparer les niveaux hormonaux entre mâles, femelles non gestantes et gestantes dans les deux derniers trimestres. Tous ces résultats ont permis de sélectionner le diagnostic de gestation (DG) le plus adapté parmi les méthodes envisagées dans ce travail. La palpation rectale associée ou non à l'échographie a aussi été étudiée, car la contention a permis de réaliser cet examen, standard chez *Bos taurus* (BT) pour le diagnostic de gestation chez l'AmB.

1. L'intérêt du diagnostic de gestation chez les animaux sauvages

L'objectif d'un DG chez les animaux au comportement sauvage est d'être fiable afin de ne pas devoir être répété. Il est également important de limiter les faux négatifs pour éviter d'abattre des animaux gestants. En effet, certaines situations poussent à l'abattage d'animaux sans interactions avec l'Homme : la limitation de population et les risques sanitaires. Dans le contexte de l'élevage, il est nécessaire d'abattre des animaux pour la consommation de viande ; cependant, l'abattage de vaches gestantes de plus de 6 mois est interdit. La connaissance du statut gestationnel est donc également importante. Dans le cadre de programmes de réintroduction nécessitant le déplacement d'animaux sur de longues distances (exemple : réintroduction de l'AmB au Canada), il est important de connaître le statut gestationnel des femelles pour ne pas faire subir ce stress à des femelles à un stade avancé de leur gestation.

La connaissance du statut gestationnel permet aussi d'allouer les ressources (humaines, alimentaires, territoriales, ...) prioritairement aux animaux gestants (Bharti et Jacob, 2019). Il permet aussi de prédire le moment des naissances afin d'en assurer un management optimum. Un DG idéal chez les animaux sauvages ne devrait pas demander de contention ou de manipulations dangereuses ou stressantes, que ce soit pour les animaux ou pour les opérateurs (Swanson, 2023). De plus, les méthodes de DG couramment utilisées chez les animaux domestiques ne sont parfois pas transposables ou nécessitent des adaptations pour les animaux sans interaction avec l'Homme. Par exemple, les seuils utilisés pour les dosages chez les espèces domestiques doivent être vérifiés chez les espèces sans interaction avec l'Homme (Safar-Hermann *et al.*, 2005).

2. Choix des méthodes de dosage

Le dosage de PAGs est depuis longtemps utilisé pour le DG chez le BT. Des kits commerciaux dédiés aux BT basés sur la technique ELISA permettent d'établir un diagnostic de gestation en 20 minutes en dosant les PAGs bovines sur sang complet. Ces tests sont semi-quantitatifs et ne fournissent pas les concentrations en PAGs dans l'échantillon (Kline *et al.*, 2024). Une méthode de dosage des concentrations en b-PSPB, une des PAGs, dans le sérum de bison AmB a été décrite (Love *et al.*, 2017), mais elle n'est pas commercialisée en Europe. Dans le cadre de notre protocole, des études préliminaires réalisées pour détecter les PAGs *in situ* dans les placentas de bisons américains (Kiewisz *et al.*, 2006) avaient déjà démontré l'intérêt d'un kit RIA caprin. Dans une autre étude, ce kit RIA caprin montrait une meilleure reconnaissance des acides aminés terminaux de l'AmB que les kits RIA BT, car la séquence des acides aminés terminaux des PAGs secrétées en fin de gestation chez l'AmB montre plus d'homologie avec les PAGs caprines que bovines (Kiewisz *et al.*, 2008). Le kit RIA caprin a donc été choisi sur base de ces données pour doser les PAGs chez le bison d'Amérique.

D'autre part, les immunodosages sont connus pour manquer de sensibilité et de spécificité pour le dosage de petites molécules comme les stéroïdes (Conley, 2016 ; Conley et Ball, 2019 ; Dufour *et al.*, 2021 ; Ledeck *et al.*, 2022). Pour développer un diagnostic de gestation simple et fiable chez un animal sauvage comme le bison d'Amérique, il fallait une méthode analytiquement sensible et spécifique pour potentiellement détecter les faibles concentrations de certaines hormones et éviter les interférences avec d'autres composés proches qui pourraient être présents dans les matrices utilisées, comme les matières fécales. En effet, des phytoœstrogènes présents dans les trèfles rouges qui sont présents dans les pâturages belges pourraient interférer avec les résultats des dosages s'ils sont confondus avec les œstrogènes produits pendant la gestation (Lewiecki *et al.*, 2018). Ces composés, à l'instar des œstrogènes mammaliens, comme l'E1 ou l'E2, sont des composés phénoliques hétérocycliques. La méthode LC-MS/MS, permettant de différencier des stéroïdes aux structures proches, évite ainsi les réactions croisées qui affectent les méthodes ELISA, améliorant ainsi la spécificité analytique (Srivastava *et al.*, 2022). En outre, diverses études rapportent de fortes variations de concentrations sériques d'E1, d'E1S ou de P4 pour le même échantillon, suivant qu'il est dosé par RIA, ELISA ou LC-MS/MS (Dufour *et al.*, 2021 ; Ledeck *et al.*, 2022). Bien que les trois méthodes nécessitent une préparation de l'échantillon, l'ELISA et la RIA peuvent être particulièrement sensibles aux effets matrice, tandis que la LC-MS/MS offre une analyse plus robuste à partir de divers fluides biologiques (Dlugash *et al.*, 2025). De nos jours, la LC-MS/MS est généralement considérée comme la méthode de référence pour la quantification des stéroïdes, offrant de hautes sensibilités et de spécificités analytiques

(Koskivuori *et al.*, 2022) et permettant de mesurer de très faibles concentrations de stéroïdes qui pourraient ne pas être détectées ou mal quantifiées par ELISA (Brouillard *et al.*, 2025). La LC-MS/MS nécessite aussi généralement un volume de sérum plus faible que l'ELISA ou la RIA pour les dosages hormonaux (Dufour *et al.*, 2021). Enfin, une seule analyse LC-MS/MS permet de quantifier simultanément plusieurs stéroïdes à partir d'une seule analyse (Dlugash *et al.*, 2025).

3. Évolution des concentrations sériques durant la gestation

La première étude s'est focalisée sur les concentrations en PAGs, P4, E1 et E1S dans le sérum des bisons d'Amérique, en incluant des mâles, des femelles non gestantes et gestantes.

3.1 Glycoprotéines associées à la gestation

Les concentrations de PAGs étaient quasi basales chez les témoins négatifs et ne différaient pas entre B ($0,21 \pm 0,12 \text{ ng/mL}$) et NP ($0,25 \pm 0,62 \text{ ng/mL}$). De même, le niveau des PAGs était faible et basal dans les trois échantillons 1TP, alors que les PAGs augmentent avec une concentration supérieure à 1 ng/mL vers le jour 20 chez les rennes (Ropstad *et al.*, 2005) et au jour 23 chez les BB (Barbato *et al.*, 2017). Chez les BT laitiers, une première brève augmentation de PAGs se produit au jour 24 de la gestation (Reese *et al.*, 2018). Elle est suivie d'une seconde augmentation vers le jour 70 (Ricci *et al.*, 2015). Dans nos résultats, en raison des rares données disponibles pour le 1TP, un pic transitoire pourrait avoir été manqué. Cependant, le dosage de la b-PSPB (Ricci *et al.*, 2015), une des PAGs, a été validé chez le bison d'Amérique (Love *et al.*, 2017) et a montré une concentration plus élevée ($1,42 \pm 1,29 \text{ ng/mL}$) en début de gestation (0 à 45 jours) que notre dosage des PAGs détectables chez l'AmB. Notre kit RIA caprin montre une bonne détection des épitopes des PAGs du bison d'Amérique *in situ* dans le placenta dès trois à quatre mois de gestation (Kiewisz *et al.*, 2008), expliquant la meilleure sensibilité en fin de gestation qu'au début, observée dans nos résultats, alors que la b-PSPB est exprimée plus précocement. De plus, une forte variabilité de la concentration de la b-PSPB est observée au cours de la période 0 à 45 jours entre les 10 individus inclus et les concentrations chez les animaux non gestants n'ont pas été rapportées dans cette étude (Love *et al.*, 2017). Davantage de données à propos de l'évolution des PAGs au début de la gestation du bison d'Amérique sont nécessaires pour expliquer les différences entre notre kit RIA pour les PAGs caprines et l'ELISA semi-quantitatif BIO-PRYN pour le b-PSPB (Love *et al.*, 2017).

Pendant les 2TP et 3TP, les concentrations de PAGs étaient inférieures à celles observées au pic chez les vaches laitières (Zoli *et al.*, 1992), mais similaires à celles observées chez les BB (Barbato *et al.*, 2017). Les concentrations totales de PAGs observées dans notre étude au cours des deux derniers trimestres de gestation étaient supérieures à celles observées avec le dosage spécifique du b-PSPB en milieu et fin de gestation chez l'AmB (Love *et al.*, 2017), contrairement aux observations au 1TP, confirmant une meilleure sensibilité de notre kit RIA en fin de gestation. Dans notre cohorte, on observe une forte variation interindividuelle dans les concentrations en PAGs chez les femelles AmB, ce qui pourrait s'expliquer par la saison de reproduction et, comme rapporté chez les vaches laitières ou les chèvres, par la parité

(Ricci *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019) et le sexe fœtal (Zoli *et al.*, 1992). Aucun échantillon n'a pu être prélevé à la fin de la gestation, juste avant la mise-bas, ce qui n'a pas permis de mettre en évidence un pic tardif des PAGs chez les femelles AmB gestantes, comme on peut le rencontrer chez le BT (Barbato *et al.*, 2022). En effet, leurs concentrations triplent entre 20 et 10 jours avant la mise-bas, jusqu'à atteindre leur concentration circulante maximale, qui survient environ cinq à 10 jours avant le vêlage (Barbato *et al.*, 2022).

3.2 Progestérone

Les concentrations de P4 sériques observées chez les mâles AmB étaient supérieures à la LLOQ décrite de 0,1 ng/mL (Dufour *et al.*, 2021) et similaires aux concentrations obtenues par immuno-dosage chez les taureaux BT (Thompson *et al.*, 1994 ; Whitlock *et al.*, 2012). La concentration en P4 sérique peut être influencée par des facteurs non liés à la reproduction. Le stress peut influencer la concentration de P4 de deux manières. Un stress aigu, comme des manipulations ou des stress sociaux, va s'accompagner d'une augmentation de la concentration de P4 (Hein et Allrich, 1992). Par exemple, une augmentation significative de la concentration en P4 peut être observée 15 minutes après l'électro-éjaculation chez les taureaux BT par libération de P4 par les surrénales (Whitlock *et al.*, 2012). En plus de son rôle dans la reproduction et le maintien de la gestation, la P4 est aussi une hormone qui peut varier suivant les réponses aux stress aigus car elle peut aussi être sécrétée par les glandes surrénales (Whitlock *et al.*, 2012). Le stress thermique va aussi induire une augmentation de la concentration en P4 dans un premier temps chez les vaches BT gestantes et non gestantes (Abilay *et al.*, 1975). Par contre, un stress thermique ou nutritionnel qui perdure et devient chronique va provoquer une diminution des concentrations en P4 sériques (Batool *et al.*, 2025 ; Fernandez-Novo *et al.*, 2020). Ainsi, le rassemblement et/ou l'immobilisation dans le système de contention pourraient entraîner une augmentation de la P4 liée à un stress aigu chez les bisons d'Amérique les plus anxieux et expliquer la forte variabilité observée entre les différents mâles. Cependant, le stress pourrait aussi expliquer la variabilité des concentrations de P4 sérique chez les femelles NP, comme chez les biches sauvages où le stress peut entraîner une augmentation de la concentration sérique en P4 et porter à confusion entre des individus gestants et non-gestants (Asher et Fisher, 1990).

Plus d'un tiers (13/32) des NP présentait une concentration en P4 sérique au-dessus de 1ng/mL au moment des prélèvements, ce qui est compatible avec la phase de dioestrus du cycle ovarien. Les prélèvements ont été réalisés en janvier et en février : ces données démontrent une potentielle absence ou perte de saisonnalité chez une partie des bisons d'Amérique prélevés en Belgique.

En raison de la limitation de la période d'échantillonnage, seules des tendances ont pu être décrites avec les quelques échantillons prélevés en 1TP, résultant d'accouplements peu fréquents en hiver. La concentration en P4 semble augmenter lentement en début de gestation, comme décrit chez d'autres ongulés tels que les rennes (Ropstad *et al.*, 2005). Aucune différence significative dans les valeurs de P4 n'a été observée entre les groupes B, NP et 1 TP. Les concentrations de P4 en 2TP étaient de $9,33 \pm 4,29$ ng/mL, celles en 3TP étaient de $11,21 \pm 3,68$ ng/mL, ce qui est supérieur aux concentrations moyennes observées chez les vaches BT, de 3-7 ng/mL au deuxième ou troisième tiers de gestation (Terblanche et Labuschagne, 1981). Une grande variabilité des concentrations de P4 sérique a été observée après 150 jours, avec des concentrations allant de 4 à 20 ng/mL après 150 jours de gestation, ce qui peut aussi être expliqué par le stress aigu provoqué par la contention des AmB les plus anxieux.

3.3 Œstrone et sulfate d'œstrone

Les échantillons sanguins des mâles bisons américains, utilisés comme témoins négatifs, ont montré des concentrations de E1 et E1S correspondant à la LLOQ décrite précédemment (Dufour *et al.*, 2021), démontrant que les AmB mâles ne produisent pas de niveaux significatifs d'œstrogènes, comme observé chez le BT (Juniewicz et Johnson, 1980), et contrairement à ce qui est décrit chez les étalons ou verrats produisant des niveaux plus élevés d'œstrogènes (Illera *et al.*, 2003 ; Raeside, 1983).

Durant le 1TP, les niveaux d'E1 et d'E1S étaient également proches de leurs valeurs de base (<2 pg/mL et $0,5 \pm 0,10$ ng/mL, respectivement), ce qui rend *a priori* impossible leur utilisation comme marqueur de début de gestation, mais cette affirmation nécessiterait davantage d'échantillons en 1TP.

Les concentrations sériques élevées d'E1 et d'E1S en 2TP et 3TP, ainsi que leur valeur basale chez les animaux NP, font de ces hormones des marqueurs potentiels de la gestation après le 93^{ème} jour de gestation chez le bison d'Amérique. La forte corrélation entre les concentrations sériques d'E1 et d'E1S chez les femelles AmB gestantes et les faibles concentrations d'E1 (en pg/mL) par rapport à celles d'E1S (en ng/mL) suggèrent que les importantes concentrations d'E1S résultent de son accumulation lors du métabolisme d'excrétion de l'E1. La production d'E1S en fin de gestation a été décrite chez les juments (Ousey 2004), les rennes (Ropstad *et al.*, 2005), les brebis (Deayton *et al.*, 1993), les chèvres (Singh *et al.*, 2019), les buffles (Hung et Prakash, 1990), les BT (Isobe *et al.*, 2003) et de nombreux autres ongulés (Geyer *et al.*, 2017). Chez les équidés et les ruminants, le site de production de l'E1S a été localisé dans le placenta (Conley, 2016 ; Schuler *et al.*, 2008). Chez les ruminants, le site de production de l'E1S est plus précisément situé dans la partie

cotylédonaire du placentome (Schuler *et al.*, 2008). La proximité évolutive des espèces étudiées et l'évolution similaire des concentrations en E1S pendant leur gestation suggèrent que l'E1S provient également principalement du placenta chez l'AmB. Comme observé chez les buffles (Hung et Prakash, 1990) et chez diverses races BT (Isobe *et al.*, 2003), les concentrations d'œstrogènes sanguins augmentent continuellement au cours des 2TP et 3TP. Chez l'AmB, la production d'E1S semble même corrélée à l'âge gestationnel. Chez le BT laitier, l'E1S augmente progressivement jusqu'à $3,7 \pm 0,5$ ng/mL au 210^{ème} jour, puis connaît une forte hausse pour atteindre une concentration de $13,5 \pm 1,0$ ng/mL vers le 270^{ème} jour de gestation (Zhang *et al.*, 1999). Les concentrations d'E1S observées en 2TP chez les femelles bisons AmB ($3,76 \pm 2,29$ ng/mL) sont assez proches des concentrations observées chez le BT laitier (Isobe *et al.*, 2003). En revanche, les valeurs d'E1S en 3TP sont inférieures à celles observées chez le BT laitier (Isobe *et al.*, 2003). Durant le 2TP, la concentration d'E1S était plus élevée chez les AmB que chez les BT viandeuses, mais après 220 jours, elles deviennent similaires (Isobe *et al.*, 2003), tout en restant inférieures à celles observées chez les buffles (Hung et Prakash, 1990). Cependant, les immuno-dosages utilisés chez les BT (Isobe *et al.*, 2003) et les buffles (Hung et Prakash, 1990) rendent difficile la comparaison avec nos résultats obtenus avec la LC-MS/MS.

Dans nos études, aucune donnée n'explique la variabilité interindividuelle dans les concentrations en E1S sériques observées chez les AmB. Le poids du veau à la naissance ou d'autres facteurs déjà décrits chez les BT de race viandeuse (Isobe *et al.*, 2003) sont susceptibles d'être impliqués dans cette variabilité. Dans de futures études, les influences du poids du veau à la naissance et de son sexe sur les concentrations en E1S devraient être étudiées. Aucun lien n'a pu être fait entre les concentrations sériques en E1S et E1 et celles de PAGs ou de P4. Des animaux en 2TP avec une concentration en E1S faible avaient aussi bien des concentrations sériques en PAGs élevées ou faibles.

4. Mise au point du dosage de l'E1S et de la P4 dans les matières fécales

Les informations obtenues grâce aux dosages sériques ont permis de mieux décrire l'endocrinologie de la gestation chez le bison d'Amérique (AmB). Cependant, réaliser des prélèvements sanguins nécessite une lourde contention (Nielsen *et al.*, 2008) qui implique des risques pour l'animal et l'utilisateur (McCorkell *et al.*, 2013). En s'appuyant sur la littérature antérieure et nos résultats décrivant les concentrations sériques de stéroïdes, une méthode de dosage a été développée sur une matrice facilement disponible : les matières fécales. L'objectif de l'utilisation des MF comme matrice pour le dosage de la P4 et de l'E1S était de mettre au point un DG fiable utilisant les MF du bison AmB qui sont aisément récoltables.

4.1 Extraction, stabilité et homogénéité des stéroïdes dans les matières fécales de bison

L'efficacité d'extraction de la P4 dans les MF était globalement faible (9 à 13%) en comparaison de l'extraction de l'E1S (63-67%). La P4 n'étant pas un bon indicateur de gestation, l'extraction de l'E1S dans les MF avait été privilégiée. Une explication des différences d'efficacité d'extraction peut résider dans le choix du méthanol comme solvant d'extraction dans les MF : ce choix doit être réfléchi en fonction de la matrice, mais aussi de l'analyte que l'on souhaite doser (Wang *et al.*, 2020 ; Zongliang *et al.*, 2018). Le méthanol est plus polaire que l'éthanol, ce qui explique les différences de solubilité entre analytes (Pappano *et al.*, 2010) et, dans notre étude, une meilleure extraction de l'E1S par rapport à la P4 dans les MF. Le lavage à l'hexane avant d'introduire la phase liquide dans la colonne de chromatographie pourrait aussi avoir modifié l'efficacité d'extraction : la P4 est hydrophobe et a donc pu être en partie perdue lors de cette étape, contrairement à l'E1S qui est hydrophile (Hložek *et al.*, 2022).

L'homogénéité des concentrations en P4 et E1S dans l'ensemble du volume des MF a été testée en prélevant des échantillons dans différentes régions des bouses. Les coefficients de variation pour l'E1S sont acceptables ($\pm 20\%$), alors qu'ils sont très élevés pour la P4 ($> 80\%$) (Dufour *et al.*, 2024). D'un point de vue pré-analytique, les concentrations en stéroïdes n'étant pas homogènes au sein des matières fécales, une étape préalable d'homogénéisation est donc recommandée.

La stabilité des concentrations en stéroïdes dans les MF conservées à 20°C a été investiguée pour déterminer les conditions de conservation des MF avant les analyses hormonales. Les concentrations de P4 ont augmenté dans les 24 premières heures pour ensuite diminuer dans les heures suivantes chez les mâles, les femelles gestantes et non gestantes. L'E1S a augmenté progressivement dans les MF de femelles gestantes pendant les 96 heures de

conservation, tandis que la concentration est restée inférieure à la LLOQ pour les mâles et les femelles non gestantes. La cinétique de la concentration des stéroïdes pendant le stockage des matières fécales à température ambiante n'affecte pas la capacité de l'E1S à être utilisé comme diagnostic de gestation, mais bien celle de la P4 qui augmente chez tous les animaux, y compris ceux qui démarrent avec des concentrations fécales faibles. Les variations de concentration de ces stéroïdes observées lors du stockage à température ambiante doivent encore être étudiées pour en comprendre les mécanismes. Des modifications des concentrations d'œstrogènes ont été observées dans les selles de femmes recevant des antibiotiques, laissant envisager une implication de la flore intestinale dans le métabolisme intestinal des œstrogènes (Adlercreutz *et al.*, 1984). Plus récemment, une rétro-conversion des œstrogènes en androgènes par les bactéries (Wang *et al.*, 2020), une réactivation des œstrogènes dans l'intestin (Cotton *et al.*, 2023) et une désulfatation de la progestérone par le microbiote intestinal ont été observées chez la truie (Wang *et al.*, 2022). Ces phénomènes pourraient expliquer l'augmentation transitoire ou continue de la P4 et de l'E1S, respectivement.

Initialement, cette étude utilisant la LC-MS/MS (Dufour *et al.*, 2021) n'était conçue que pour mesurer deux stéroïdes : P4 et E1S. Cependant, la technologie LC-MS/MS est multiplexable et d'autres stéroïdes pourraient être ajoutés à la méthodologie actuelle pour étudier avec précision la cinétique des stéroïdes dans les matières fécales. Un panel hormonal incluant d'autres dérivés œstrogéniques et progestéroniques permettrait peut-être d'expliquer l'augmentation de l'E1S par la diminution d'un autre dérivé stéroïdien dans les matières fécales conservées à température ambiante.

La conservation à 20°C des MF ayant occasionné des modifications des concentrations d'E1S et de P4, il est recommandé de les congeler (-20°C) jusqu'à leur analyse, pour conserver la fiabilité de la quantification de l'E1S et de la P4. Cependant, s'il est impossible de congeler rapidement les échantillons, l'E1S dans les MF resterait un potentiel bon marqueur de gestation chez l'AmB.

4.2 Concentration en stéroïdes dans les matières fécales de bison

De nombreuses études ont montré que les œstrogènes fécaux (conjugués ou non) sont de bons marqueurs de la gestation chez plusieurs espèces des ruminants (Kapke *et al.*, 1999 ; Messier *et al.*, 1990 ; Mostl *et al.*, 1984 ; Safar-Hermann *et al.*, 2005). La concentration médiane d'E1S observée dans notre étude chez les femelles bisons AmB gestantes (250 pg/mL) était inférieure à celle observée dans une étude antérieure (Kirkpatrick *et al.*, 1992) utilisant un kit RIA pour doser les œstrogènes sulfatés totaux. Toutes les femelles gestantes présentaient des concentrations d'E1S supérieures à la LLOQ de 20 pg/g dans les matières

fécales, à l'exception d'une femelle au 1TP (le seul animal disponible à cette période) et d'une autre qui a avorté spontanément peu après le prélèvement. Aucun échantillon de matières fécales des groupes B et NP n'a montré des niveaux mesurables d'E1S. La forte corrélation observée ($r = 0,77$) entre les concentrations sériques et fécales d'E1S n'avait jamais été rapportée chez les bisons AmB, même si une forte corrélation ($r = 0,904$) a été observée entre les concentrations sérique et fécale d'E1S chez les truies (Ohtaki *et al.*, 1999).

Les concentrations de P4 observées dans les matières fécales de bisons américains gestants à l'aide de la LC-MS/MS étaient du même ordre que celles observées par ELISA chez des bisons européens précédemment superovulés (Othen *et al.*, 1999) et inférieures à celles des premières études utilisant le RIA sur un petit nombre d'animaux gestants (Kirkpatrick *et al.*, 1992). La dégradation de la P4 par le métabolisme hépatique pourrait expliquer les faibles concentrations observées dans les matières fécales, même chez les femelles AmB gestantes (Wiltbank *et al.*, 2014). La présence de P4 sulfatée (Wang *et al.*, 2022) ou d'autres métabolites de P4 (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006) pourrait aussi expliquer cette différence, car notre méthode LC-MS/MS a été conçue pour doser uniquement la P4 et non ses métabolites (Dufour *et al.*, 2021). Les concentrations de P4 étaient supérieures à la LLOQ chez les NP et présentaient une grande variabilité, malgré la bonne reproductibilité de notre test LC-MS/MS (Dufour *et al.*, 2021). Cette variation des niveaux de P4 pourrait être expliquée par la production surrénalienne de celle-ci qui peut être induite par le stress (Hollenstein *et al.*, 2006), comme discuté précédemment. D'un autre côté, l'échantillonnage a eu lieu en janvier, février ou début mars, lorsque la plupart des femelles NP bison d'Amérique devraient être en anœstrus (Cervantes *et al.*, 2016). Cependant, un quart de ces vaches AmB avait des concentrations fécales de P4 et un tiers des concentrations sériques de P4 supérieures à la concentration la plus basse observée pendant la gestation, suggérant qu'elles étaient en diœstrus, ce qui est compatible avec une perte partielle de saisonnalité observée dans les troupeaux belges. Comme chez de nombreuses espèces, le dosage de la P4 dans les MF ne peut donc être utilisé pour le diagnostic de gestation (Conley, 2016 ; Henricks *et al.*, 1972 ; Senger 2015).

De la même manière, la variabilité interindividuelle de la P4 dans les MF était importante au 2TP comme au 3TP et aucun pic n'était observé. Étant donné la bonne reproductibilité de la technique de LC-MS/MS, la méthode d'analyse ne peut expliquer cette variabilité (Dufour *et al.*, 2024). En revanche, des facteurs modulant la production placentaire de P4 pourraient être impliqués comme le stress nutritionnel précédemment décrit chez les BT (Shemesh *et al.*, 1990; Shemesh 1994) et la production surrénalienne liée au stress décrite ci-dessus (Asher et Fisher, 1990 ; Hollenstein *et al.*, 2006).

La corrélation entre les concentrations en P4 dans le sérum et dans les MF est modérée, ce qui concorde avec les études précédentes chez différentes espèces, avec une corrélation allant de 0,31 pour le daguet brun (Tanaka *et al.*, 2019), en passant par 0,57 chez l'hippopotame et allant jusqu'à 0,79 chez l'okapi (Meunier *et al.*, 2022). La faible homogénéité de la P4 dans les échantillons fécaux pourrait expliquer en partie cette corrélation modérée, comme observé chez d'autres espèces, comme le daguet brun (Dufour *et al.*, 2024 ; Tanaka *et al.*, 2019).

Lors de la mise au point de la méthode LC-MS/MS pour le dosage de stéroïdes dans les MF, seuls les dosages de P4 et l'E1S ont pu être développés et validés. D'autres méthodes LC-MS/MS multiplexées pourraient cependant être utilisées pour mieux décrire les concentrations hormonales dans les MF chez des femelles gestantes ou non.

5. Comparaison des différentes méthodes de diagnostic de gestation chez le bison d'Amérique

Au cours de nos études, quatre dosages hormonaux sériques (PAGs, P4, E1, E1S) et deux fécaux (P4, E1S) sont apparus comme de potentielles méthodes de diagnostic de gestation. Ces méthodes ont été comparées à la palpation transrectale avec ou sans échographie, méthode la plus utilisée chez *Bos taurus* (BT).

Il s'est avéré que le TRPUS, pourtant éprouvée chez le BT, n'est pas facilement adaptable chez le bison d'Amérique tant du point de vue de la contention peu aisée chez ces animaux que du point de vue de la conformation du bassin. En raison du caractère sauvage de l'animal (McCorkell *et al.*, 2013), cette procédure était limitée à trois minutes et, en cas de danger pour l'opérateur ou l'animal, la procédure était immédiatement interrompue, ce qui implique que l'échographie n'a ainsi pas été réalisée pour 10 femelles bison d'Amérique (AmB) sur 92. Avec cette limite de durée, les TRPUS étaient concluantes dans environ 71 % (58/82 bisons) des cas. Les TRPUS étaient considérées comme non concluantes lorsque l'opérateur n'a pas pu déterminer le statut gestationnel. Pour les 24 TRPUS non concluantes, il s'est avéré que 16 vaches étaient non gestantes car aucune mise-bas n'a été observée pour ces vaches dans les 276 jours qui ont suivi les prélèvements. Parmi les huit restantes, six étaient en 3TP (en moyenne à $213 \pm 4,21$ jours de gestation), une en (fin de) 2TP et la dernière en 1TP. Chez le BT, le fœtus est en position abdominale basse entre cinq et sept mois de gestation, ce qui peut prêter à confusion avec un animal non gestant (Hopper, 2021). De plus, des différences de conformation du bassin entre les BT et les bisons d'Amérique (*figure 4*) ont été observées par les praticiens buiatres participant à cette étude. La conformation a pu être perturbante pour les premières TRPUS, mais les opérateurs s'y sont rapidement adaptés. Par contre, les images échographiques n'étaient pas différentes, la morphologie des cotylédons et du fœtus étant très proche de celle observée chez les BT. Néanmoins, les praticiens buiatres participant à cette étude n'ont pas été en mesure d'indiquer l'âge gestationnel du fœtus, principalement en raison de la nécessité de raccourcir la durée de l'examen, mais aussi par manque de repères. En effet, le poids du veau AmB (15-30 kg) à la naissance étant largement inférieur à celui des veaux BT laitiers (40-45 kg) ou allaitants (45-50 kg), la taille du veau *in utero* doit aussi être moins importante. Les Se (100%), Sp (81,62%), VPP (90,6%) et VPN (92,5%) de la TRPUS sont comparables à celles obtenues chez le BT, avec des VPP de plus de 80 %, dépendant surtout de l'expérience du vétérinaire, et des VPN plus faibles. La VPP de 80% est généralement expliquée par un DG précoce positif sans confirmation avec un DG tardif (JaŚkowski *et al.*, 2019).

Les méthodes de dosage dans le sérum et les matières fécales étant validées, elles ont été envisagées comme de potentiels outils de diagnostic de gestation et leurs Se, Sp, VPN, VPP ont été comparées aux méthodes physiques.

Les dosages sériques de PAGs ont une Se de 92%, dans la gamme de ce qui a été rapporté avec BIO-PRYN ELISA pour la b-PSPB en fin de gestation chez le bison d'Amérique (91,4%), et une Sp de 97%, légèrement inférieure à ce qui a été observé (100%) dans cette étude (Love *et al.*, 2017). La VPP est de 98% et la VPN est de 93%. Dans notre étude, trois vaches AmB à environ six mois de leur gestation avaient des concentrations sériques de PAGs inférieures au seuil fixé par les procédures ROC, ce qui a conduit à une baisse de notre Se. D'autre part, la Sp observée dans notre étude et dans l'article utilisant le BIO-PRYN ELISA pour la b-PSPB (Love *et al.*, 2017) pourrait s'expliquer par l'échantillonnage d'animaux précédemment gestants. Chez l'AmB, les PAGs pourraient ne revenir à leur niveau basal qu'après un mois, comme cela a été observé chez les BB (Barbato, *et al.*, 2017) ou entre 60 et 80 jours PP, comme chez le BT (Filho *et al.*, 2020). D'autre part, le dosage des PAGs dans le sérum du bison d'Amérique ne permet pas de déterminer si les animaux étaient en 2TP ou 3TP, en raison de la production constante des PAGs en fin de gestation (Frisee *et al.*, 2022) également observée chez les BB (Barbato *et al.*, 2017), mais contrairement à ce qui est observé chez les BT (Shahin *et al.*, 2014). De plus, l'échantillonnage dans nos études reste, en comparaison de ce qui a été réalisé chez d'autres ruminants domestiques, plus faible et ne permet pas de tirer de conclusions définitives.

Le dosage de la P4 dans le sérum pour le diagnostic de gestation a montré une Se de 100% et une Sp de 93%, mais son dosage n'était pas fiable pour déterminer la période de gestation. La VPP est de 93% et la VPN est de 100%. Depuis longtemps, la concentration sérique de P4 >1 ng/mL n'est pas considérée comme un diagnostic de gestation, alors qu'une concentration de P4 < 1 ng/mL est associée à un diagnostic de non-gestation, comme le confirme la VPN (Nebel, 1988).

Le diagnostic de gestation chez l'AmB à l'aide des dosages sériques d'E1 et d'E1S a conduit à des Se de 92% et à des Sp de 97%, qui peuvent être augmentées lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec la P4. En effet, la Se augmente à 100% et la Sp à 96% lorsque les dosages de l'E1S et de la P4 sont combinés pour obtenir un DG. Elles deviennent alors similaires aux résultats de l'étude sur la b-PSPB utilisant BIO-PRYN ELISA chez le bison d'Amérique (Love *et al.*, 2017). La VPP pour l'E1 et l'E1S est de 97% et la VPN est de 91%. La production placentaire d'E1S est décrite depuis longtemps chez les ruminants (Hung et Prakash, 1990 ; Isobe *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2019 ; Tsang, 1974), ce qui explique l'intérêt pour cette hormone comme marqueur de la gestation, car elle est spécifique et sa concentration sanguine diminue rapidement après le vêlage (Shah *et al.*, 2007). Le dosage de

l'E1S sérique est utilisé pour le diagnostic de gestation chez la truie (Moenter *et al.*, 1992) et chez les ruminants domestiques (Shah *et al.*, 2007), mais n'est utilisable en routine qu'à partir du deuxième trimestre de gestation dans notre étude, comme chez la vache BT (Shah *et al.*, 2006). De plus, les dosages sériques d'E1 et d'E1S réalisés en LC-MS/MS ont tous deux montré des différences entre le 2TP et le 3TP (Frisee *et al.*, 2022), et la procédure ROC réalisée a permis d'observer une Se de 84% et une Sp de 73% pour déterminer le trimestre de gestation avec l'E1S, mais pas avec l'E1 (Se et Sp de 66% et 65% respectivement).

Les dosages fécaux de P4 et d'E1S ont été envisagés comme de potentiels outils de diagnostic de gestation chez le bison d'Amérique en raison de la difficulté pratique et technique de diagnostiquer la gestation par les méthodes physiques ou par des dosages sériques. L'utilisation du dosage de la P4 dans les matières fécales comme diagnostic de gestation pour le bison d'Amérique a conduit à des valeurs de Se de 93%, de Sp de 97%, de VPP de 96% et de VPN de 94%. La concentration sanguine et dans le lait de P4 est connue pour être modifiée chez les vaches BT gestantes après un défi nutritionnel (Izhar *et al.*, 1992; Shemesh, 1990 ; Shemesh *et al.*, 1994). Le déficit énergétique chez la vache BT provoque un stress nutritionnel qui augmente le flux hépatique et diminue alors la concentration sanguine en P4 (Ponter et Grimard, 2013). Le microbiote intestinal impacte aussi la concentration fécale en P4 (Wang *et al.*, 2022). Ces différents paramètres peuvent expliquer la grande variabilité inter- et intra-individuelle observée dans nos études. Tous ces facteurs font que la P4 fécale n'est pas un bon marqueur de gestation chez le bison d'Amérique. Cependant, le dosage de la P4 fécale permet de suivre le cycle œstral chez les BT : ses concentrations sont faibles pendant la phase folliculaire et augmentent significativement pendant la phase lutéale (Isobe *et al.*, 2005). Une concentration élevée de P4 fécale, généralement supérieure à un seuil de 50 ng/g, indique la phase lutéale ou une gestation, tandis qu'une faible concentration accompagne la phase folliculaire (Isobe *et al.*, 2005), comme suggéré précédemment pour la P4 sérique. Le dosage de la concentration en 5 α -pregnanes dans les MF pourrait offrir une alternative non invasive pour évaluer la cyclicité, mais pourrait aussi être utilisé comme outil de diagnostic de gestation précoce (Schwanzerberger *et al.*, 1997). Les concentrations de 5 α -pregnanes sont fortement corrélées aux concentrations sériques de P4 (Kumar *et al.*, 2013) et sont dépendantes du type d'alimentation chez le BT.

Le dosage de l'E1S dans les MF des femelles AmB gestantes et non gestantes incluses dans cette étude a conduit à un diagnostic de gestation quasiment parfait, comme suggéré dans les études antérieures (Kirkpatrick *et al.*, 1992). En se basant uniquement sur les 2 et 3TP, cette méthode présente des Se (100%), Sp (100%), VPP (100%) et VPN (100%), plus élevées que tous les autres moyens de détection de la gestation proposés dans nos études, mais aussi que l'ELISA BIO-PRYN pour le dosage du b-PSPB dans le sérum de bisons d'Amérique en fin

de gestation (Love *et al.*, 2017). Le seul inconvénient actuel est l'impossibilité de déterminer le trimestre de gestation, même si une corrélation modérée entre la concentration d'E1S dans les MF et le jour de gestation a été observée dans nos données. Une augmentation des effectifs de femelles AmB gestantes pourrait contribuer à améliorer la détermination du trimestre de gestation par le dosage de l'E1S dans les MF.

Une concentration d'E1S dans les MF inférieure à la LLOQ peut donc être interprétée de différentes manières : mâle, femelle non-gestante ou en début de gestation. Pour résoudre cette inconnue, la concentration d'E1S dans les fèces devrait être étudiée en 1TP afin de déterminer le début de son excrétion et après le vêlage afin de déterminer le temps nécessaire pour revenir en dessous de la LLOQ. Un panel hormonal plus large, incluant d'autres dérivés d'œstrogènes, des dérivés de la P4 et de la testostérone permettrait peut-être de différencier les mâles des femelles non gestantes ou en 1TP. Ces profils hormonaux plus larges, réalisables en une seule analyse avec les techniques de LC-MS/MS, pourraient aussi être utilisés pour mieux décrire les changements hormonaux au cours du cycle du bison d'Amérique.

6. Taux de mise-bas et saisonnalité

L'objectif secondaire de ce travail était d'étudier la saisonnalité et le taux de mise-bas des AmB élevés en Belgique et de les comparer avec les données disponibles en Amérique du Nord dans des élevages extensifs et des parcs naturels. Durant les deux années d'étude, une perte partielle de la saisonnalité et une faible fécondité ont été observées.

Le taux de mise-bas, rapport entre le nombre de femelles ayant mis bas sur l'année et le nombre total de femelles présentes, observé chez les 92 femelles de nos élevages belges est de 57%, ce qui est inférieur au taux de mise-bas observé chez les bisons AmB et WB en liberté dans le Parc National de Yellowstone, qui est de l'ordre de 65-78% (White *et al.*, 2015). En comparaison, le taux de mise-bas annoncé dans les élevages extensifs de bisons captifs aux U.S.A. est de 90% (Johnston, 2010), ce qui est comparable aux taux observés dans les élevages de BT allaitants et laitiers belges. Bien que les animaux inclus dans nos études bénéficient de certains soins dispensés aux animaux d'élevage (vermifuges, compléments alimentaires, dépistage des maladies transmissibles), ils présentent des performances inférieures à celles observées chez des animaux sauvages en liberté. Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer cette faible fécondité.

Le nombre de taureaux bisons AmB conseillé en production est de un taureau pour 12 femelles pour les grands groupes ($n > 200$ individus) et de un pour 25 pour les petits groupes (Johnston, 2010). Ce ratio était respecté dans les troupeaux suivis en Belgique, où le ratio mâle par femelle était de un pour 10 ou de un pour 15 dans les deux ranchs. De tels ratios ne peuvent donc pas expliquer à eux seuls le faible taux de gestations observé, à moins que certains mâles de notre étude aient présenté de l'infertilité.

Chez les BT comme dans d'autres espèces, l'effet mâle désigne la stimulation de la reproduction chez les vaches par la mise en présence d'un taureau (Custer *et al.*, 1990). Bien que cet effet soit moins marqué chez les vaches laitières à haut rendement, la mise en présence d'un taureau peut accélérer l'apparition des chaleurs chez les vaches BT (Shipka et Ellis, 1998). Chez les BB, l'exposition au mâle en post-partum relance plus rapidement la cyclicité et améliore la fertilité en première insémination (Gokuldas *et al.*, 2010). Dans les parcs nationaux, on observe que les mâles AmB forment un sous-groupe éloigné des femelles hors des périodes de reproduction et ne se rapprochent des femelles qu'en saison de reproduction, lorsque les femelles dominantes sont en œstrus (Acevedo et Barfield, 2023 ; Vervaecke et Schwarzenberger, 2006). On peut ainsi supposer que l'effet mâle est présent aussi chez les AmB et contribue donc à maintenir la saisonnalité. La présence permanente des taureaux avec les femelles dans les ranchs étudiés en Belgique pourrait donc participer à cette diminution de la saisonnalité.

Les deux ranchs belges ne gèrent pas les bisons comme des BT en les rentrant en hiver et en les nourrissant avec une ration préparée : l'hypothèse d'une cyclicité continue sur base d'un flush alimentaire est donc peu probable.

La surface renseignée pour un élevage de 4000 têtes de bisons AmB en Californie est de 22.257 ha (Scarnecchia, 1985) alors qu'en Belgique, les élevages étudiés renseignaient 25 bisons pour 19 ha ou 26 bisons pour 21 ha. Le rapport observé dans les élevages américains est de un bison pour 5,5 ha contre un bison pour 0,8 ha en Belgique. L'indice Unité Gros Bovin (UGB) correspond à une vache de 600 kg qui n'est pas en lactation sur une prairie de bonne qualité (Benoit et Veyssset, 2021). Les femelles bisons AmB pèsent en moyenne 500-600 kg, mais leurs veaux, même sevrés, accompagnent les mères durant l'ensemble de la saison, menant à l'estimation de 1,5 UGB par bison. On considère qu'il faut 1ha par UGB, mais la qualité de la prairie intervient aussi dans le calcul et il faut moduler par un facteur 1 pour une prairie de bonne qualité et un facteur 2,5 pour une prairie de mauvaise qualité. On arrive donc à une superficie nécessaire de 1,5 à 4,5 ha par bison par an. On constate que les troupeaux belges sont largement en-dessous de ce qui est recommandé. Malgré une complémentation en prairie, on peut supposer que les apports alimentaires ne sont pas optimaux. Cependant, les scores corporels (BCS) des bisons belges semblaient être suffisants et en accord avec les standards attendus chez les BT, car il n'existe pas d'échelle d'évaluation du BCS pour le bison d'Amérique. En revanche, il existe une échelle d'évaluation du BCS pour le bison européen graduée de un à cinq (Zielke *et al.*, 2018) qui permettrait peut-être de déterminer plus précisément le BCS des AmB et ainsi de mieux préciser si les apports alimentaires sont suffisants. Des études futures devraient déterminer si cette échelle de score est transposable du bison Européen à l'Américain. Le facteur nutritionnel semble déterminant pour expliquer la faible fécondité, mais il pourrait aussi avoir un impact sur la saisonnalité. En effet, des apports énergétiques plus faibles dus au surpâturage des prairies pourraient participer à réduire l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Tanaka *et al.*, 2019) au moment de la saison de reproduction, ce qui pourrait limiter la fertilité et ainsi retarder la saison de mise-bas. A l'inverse, la complémentation continue en nourriture pourrait aussi expliquer une diminution de la saisonnalité des femelles AmB vivant en Belgique.

Les données de la littérature à propos des troupeaux sauvages indiquent que la période d'œstrus s'étend généralement de mi-juillet à mi-août et la période de mise-bas de mi-avril à fin mai (Meagher, 1973). Un allongement de la période de cyclicité chez les femelles s'étendant jusqu'en septembre (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006) et octobre a aussi été observée (Love *et al.*, 2017), ce qui mènerait à des mises bas jusqu'en juillet. Cependant, ces données n'expliquent pas que, dans les élevages belges étudiés, 11,8% des mises-bas se sont déroulées en octobre ou en novembre, ce qui implique une saillie en janvier ou février

(Frisée *et al.*, 2022). De plus, nos prélèvements ont permis de constater la présence de concentrations de P4 compatibles avec un diœstrus chez un tiers des femelles non-gestantes prélevées en janvier ou février, indiquant une cyclicité hivernale (Frisée *et al.*, 2022). Dans nos études, 25% des mises bas se déroulent en dehors de la saison décrite pour le bison d'Amérique. Cette perte de la saisonnalité entraîne une augmentation de la fréquence des mises bas par conditions boueuses et froides, facteur de risque de mortalité néonatale. Cette différence entre les bisons d'Amérique élevés aux U.S.A. et en Belgique reste difficile à expliquer, car la saisonnalité, liée à la lumière et à la mélatonine (Tanaka *et al.*, 2019) n'a pas encore été clairement établie chez le bison d'Amérique. Le climat océanique belge avec des hivers tempérés et pluvieux pourrait aussi expliquer la reproduction et la mise-bas non saisonnières, car il semblerait que le vent froid soit le principal facteur associé à la diminution de la cyclicité chez les AmB et WB sans interaction avec l'Homme ou captifs aux U.S.A. plus encore qu'une température froide (Licht et Johnson, 2018).

Les données de la littérature et nos études ne nous permettent pas d'expliquer définitivement la perte de saisonnalité observée chez les bisons d'Amérique élevés en Belgique. Les données rétrospectives d'élevage reprenant l'âge des femelles, l'intervalle vêlage-vêlage, l'âge au premier vêlage ne sont pas disponibles, mais elles pourraient cependant peut-être permettre de mieux comprendre les observations faites sur la saisonnalité des bisons d'Amérique élevés en Belgique.

La faible surface de pâturage, la complémentation alimentaire hivernale, la présence continue des mâles et les conditions météorologiques belges sont les principales hypothèses pour expliquer les constatations actuelles dans les élevages étudiés. De futures études incluant d'autres élevages d'AmB élevés en Europe dans des conditions zootechniques et climatiques semblables seraient nécessaires pour apporter des informations sur la régulation endocrinienne de la saisonnalité, ainsi que sa modulation par la nutrition.

7. Limites des trois études

Nos études ont été réalisées sur des troupeaux de petite taille lors des prélèvements annuels pour des dépistages obligatoires. On peut se demander si les techniques développées sont applicables à des troupeaux de plus grande taille, notamment la prise de sang et le TRPUS qui demandent une importante contention. De plus, peu d'animaux inclus dans nos études étaient en 1TP, ce qui laisse une zone grise pour ce stade de gestation. Alors qu'un diagnostic de gestation hormonal positif permet d'identifier clairement une femelle gestante de plus de 93 jours, un résultat négatif implique plusieurs hypothèses : prélèvement provenant de B, de NP ou de 1TP. En effet, seule l'absence de P4 sérique permet de tirer une conclusion de non-gestation, alors que sa présence ne permet aucune conclusion. Ce diagnostic de non-gestation est critique chez les animaux sauvages et de production, mais pour des raisons différentes : dans le cadre de la conservation des animaux sauvages, il faut éviter de prélever un animal potentiellement gestant.

Le coût d'un instrument LC-MS/MS constitue une limite de la méthode, car tous les laboratoires ne peuvent pas supporter les coûts pour acquérir, entretenir et utiliser un tel équipement. Cependant, les spécificités et sensibilités analytiques supérieures de cette méthode, ainsi que la possibilité de multiplexage, représentent les indications majeures pour le recours à cette technologie (Dufour *et al.*, 2021 ; Ledeck *et al.*, 2022 ; Peris *et al.*, 2007) dont les prix devraient se démocratiser dans le futur.

Malheureusement, les données de suivi d'élevage, comme l'intervalle naissance-vêlage et les intervalles entre vêlages, étaient incomplètes. Ces données auraient permis de comparer les performances de reproduction des AmB élevés en Ardenne belge avec d'autres études menées ailleurs en Belgique (Vervaecke et Schwarzenberger, 2006) et une étude de synthèse (Acevedo et Barfield, 2023).

A l'heure actuelle, opérer une LC-MS/MS représente un coût élevé pour un laboratoire. Par contre, cette technologie permet de doser plusieurs molécules en une seule analyse, en ne nécessitant que des solvants peu coûteux. Actuellement, pour un dosage en LC-MS/MS de 10 hormones, le prix est aux alentours de 100 euros. Cette technique n'est pas encore appliquée en routine pour les *bovinae*, mais plus elle sera utilisée, plus le prix diminuera pour atteindre des prix compétitifs.

8. La conservation de l'espèce et la gestion des parcs naturels

La conservation des espèces est un élément clé pour la biodiversité. L'AmB est une espèce menacée, mais sa population augmente depuis que des plans de conservation ont été mis en place. Des accords ont permis de maintenir une partie de son habitat naturel et le protègent en partie du braconnage.

En reprenant l'exemple de Yellowstone, le parc essaie de maintenir un équilibre de sa population aux alentours de 4000 têtes avec un ratio mâle-femelle de 1:1 et un ratio adultes-jeunes de 70:30. Les responsables du parc connaissent les flux migratoires au sein du parc. Depuis 2000, huit tribus amérindiennes ont le droit d'abattre les AmB ou WB quittant les territoires du parc et entrant au Montana, selon un accord entre le gouvernement américain, les autorités du parc et ces tribus. Ces tribus, en ayant le droit d'abattre les AmB qui passent les frontières nord du parc, protègent en réalité les BT et les bisons AmB ou WB d'élevage de la brucellose, maladie endémique dans le parc de Yellowstone. Par contre, en 2023, 1175 bisons du parc de Yellowstone ont été abattus ou braconnés. Ces pertes d'effectifs d'animaux importantes ont interpellé l'opinion publique (Robbins, 2023). Même si les abattages sont légalement encadrés et se justifient du point de vue de la propagation de maladies contagieuses, l'abattage d'animaux gestants reste difficile à admettre. Des solutions seraient envisageables, comme tenter de maintenir au sein du parc les femelles qui sont avancées dans leur gestation. Dans ce cadre, le diagnostic de gestation sur MF peut apporter une aide précieuse dans la gestion des animaux des parcs, en confirmant les animaux en 2TP ou 3TP. Le développement d'un diagnostic de gestation précoce (1TP) sur les MF permettrait encore de limiter encore un peu plus le risque d'abattre un animal gestant.

D'autre part, le couplage du diagnostic de gestation avec le testage ADN (Forgacs *et al.*, 2019) dans les MF permettrait d'identifier les individus gestants, sur base des profils génétiques présents dans les banques de données des parcs. Cette approche pourrait aussi être couplée à la recherche de brucellose dans les MF. La recherche de *Brucella spp.* dans les matières fécales est une technique non invasive, mais qui présente des limites (Sharma *et al.*, 2024), *Brucella spp.* étant excrétée de manière variable dans les MF des animaux séropositifs (Godfroid *et al.*, 2010). Par contre l'identification du pathogène dans les MF confirme que le ruminant est bien porteur de *Brucella spp.* (Sharma *et al.*, 2024). En regroupant les trois méthodes, une mise en quarantaine des animaux gestants porteurs de brucellose jusqu'à la mise-bas serait envisageable (White *et al.*, 2011).

En outre, un diagnostic de gestation disponible sur les matières fécales offre aussi une opportunité d'étudier la fertilité dans les troupeaux de bisons d'Amérique, sauvages ou non. Le prélèvement de matières fécales peut être réalisé sans contention, en observant

simplement le troupeau et en attendant qu'il bouge, avant d'accéder aux échantillons en toute sécurité, pour ensuite déterminer les proportions d'animaux gestants dans la population

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse avait pour ambition de répondre à un défi en matière de gestion de la faune sauvage, celui de disposer d'un outil fiable, non invasif et applicable sur le terrain pour le diagnostic de gestation chez des herbivores sauvages tels que le bison d'Amérique. Pour cette espèce emblématique, la manipulation physique est complexe, coûteuse et potentiellement dangereuse, tant pour les individus que pour les intervenants. Les méthodes conventionnelles utilisées chez les *Bos taurus* domestiques comme la palpation transrectale, l'échographie ou les analyses sanguines sont donc difficilement transposables chez les espèces sauvages. Dans ce contexte, l'objectif principal consistait à développer une approche permettant d'évaluer le statut gestationnel sans recourir à la contention, afin de faciliter le suivi reproductif des troupeaux, en conditions extensives ou naturelles.

Les analyses endocriniennes réalisées au cours de ces études ont permis d'apporter des connaissances nouvelles sur la physiologie de la gestation chez le bison d'Amérique. Les profils hormonaux sériques observés confirment la pertinence de plusieurs marqueurs classiquement utilisés chez les ruminants domestiques, notamment l'œstrone et le sulfate d'œstrone, ainsi que les glycoprotéines associées à la gestation. Ces résultats contribuent à combler un déficit de données physiologiques pour cette espèce et offrent des bases de comparaison utiles avec les BT domestiques et d'autres grands ruminants. Toutefois, ces prélèvements nécessitent la capture et la contention répétées des animaux, ce qui est rarement envisageable, limitant l'intérêt pratique des dosages sériques comme diagnostic de gestation et soulignant la nécessité d'outils alternatifs.

L'apport central de cette thèse réside dans le développement et la validation d'un diagnostic de gestation fondé sur le dosage du sulfate d'œstrone dans les matières fécales par LC-MS/MS. Au-delà de l'aspect technique, cette innovation ouvre des perspectives concrètes pour la gestion des troupeaux d'animaux sauvages. Elle permet notamment d'éviter des interventions invasives sur des femelles gestantes, d'adapter les stratégies de prélèvement et d'optimiser les ressources alimentaires associées aux animaux gestants. Dans certains contextes, elle pourrait également contribuer à limiter les pertes reproductives liées au stress ou aux manipulations. Cette approche permet un suivi non invasif de la dynamique reproductive des troupeaux sauvages ou d'élevage, d'évaluer leur fécondité et d'anticiper leur évolution démographique. Ces informations sont essentielles pour une gestion durable des populations sauvages, en particulier dans un contexte de changements environnementaux et de diminution de leur habitat naturel. Les résultats obtenus démontrent que le sulfate d'œstrone permet d'identifier les femelles gestantes avec une excellente fiabilité durant les deux derniers tiers de la gestation. Il serait aussi intéressant de réaliser ces dosages dans les

mêmes matrices chez *Bos taurus* (BT) avec la LC-MS/MS, technique qui s'est imposée aujourd'hui comme la référence pour le dosage des stéroïdes. Cela permettrait peut-être de redéfinir des valeurs de référence chez le BT.

Cette méthode ne permet cependant pas actuellement une détection fiable pendant le premier tiers de gestation, période durant laquelle les concentrations en E1S sont probablement insuffisantes pour discriminer les animaux gestants ou non. L'identification de marqueurs précoces constitue donc une perspective de recherche : d'autres stéroïdes ou métabolites hormonaux pourraient aider à étendre le diagnostic à l'ensemble de la gestation.

Sur le plan appliqué, ce travail fournit un outil concret et directement utilisable par les gestionnaires de la faune, les vétérinaires et les responsables de parcs ou de réserves. Sur le plan scientifique, il enrichit la connaissance de la physiologie reproductive d'une espèce clé des écosystèmes nord-américains. Plus largement, les résultats obtenus dépassent le cadre du bison d'Amérique. Ils démontrent la faisabilité et l'intérêt d'un suivi endocrinien non invasif chez les grands ruminants, qu'ils soient sauvages ou domestiques. Cette approche pourrait ainsi être transposée à d'autres espèces pour lesquelles les méthodes conventionnelles nécessitant une contention sont difficiles à mettre en œuvre.

Ainsi, ce travail met à la disposition des gestionnaires de la conservation des bisons d'Amérique, et des scientifiques qui les étudient, un outil fiable de diagnostic de gestation qui ne nécessite aucune manipulation de l'animal. Il permet ainsi de contourner une contrainte majeure de la gestion du bison d'Amérique. Plus largement, cette thèse démontre le grand potentiel des techniques non invasives qui permettent d'envisager des études scientifiques sur de plus larges populations d'animaux sauvages, en respectant au maximum leur bien-être, afin de faciliter une gestion plus adaptée de ces populations.

Bibliographie

- Acevedo, C., and Barfield, J. 2023. 'Review: Reproductive physiology of bison and application of assisted reproductive technologies to their conservation', *Animal*, 17: 100842.
- Adlercreutz, H., Pulkkinen, M., Hamalainen, E., and Korpela, J. 1984. 'Studies on the role of intestinal bacteria in metabolism of synthetic and natural steroid hormones', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 20: 217-29.
- Abilay, T., Johnson, H., Madan, M. 1975. 'Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle', *Journal of Dairy Science*, 58: 1836-40.
- Allen, E. and Doisy E.. 1923. 'An Ovarian Hormone: Preliminary Report on Its Localization, Extraction and Partial Purification, and Action in Test Animals', *The Journal of the American Medical Association*, 81 : 819–21.
- An, G., Bach, T., Abdallah, I., and Nalbant, D. 2020. 'Aspects of matrix and analyte effects in clinical pharmacokinetic sample analyses using LC-ESI/MS/MS - Two case examples', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 183: 113135.
- Asdell, S. 1964. 'Patterns of mammalian reproduction' Comstock Publishing Associates: Ithaca, New York.
- Asher, G., Fisher, M. 1990. 'Reproductive physiology of farmed red deer and fallow deer'. *Proceedings from the Second International Wildlife Ranching Symposium*. Edmonton, Alberta, Canada: 163–5.
- Ballatori, N., Christian, W., Wheeler, S., and Hammond, C. 2013. 'The heteromeric organic solute transporter, OST α -OST β /SLC51: A transporter for steroid-derived molecules', *Molecular Aspects of Medicine*, 34: 683-92.
- Batool, I., Kausar, R., Qamar, M. 2025. 'Progesterone-mediated immunomodulation in ruminant early pregnancy: mechanisms and implications for bovine fertility', *Veterinary Research Communications*, 4: 21.
- Barbato, O., Sousa, N. M., Debenedetti, A., Canali, C., Todini, L., and Beckers, J. F. 2009. 'Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes', *Theriogenology*, 72: 993-7.
- Barbato, O., Melo de Sousa, N., Barile, V. L., Canali, C., and Beckers, J. F. 2013. 'Purification of pregnancy-associated glycoproteins from late-pregnancy *Bubalus bubalis* placentas and development of a radioimmunoassay for pregnancy diagnosis in water buffalo females', *BMC Veterinary Research*, 9: 89.
- Barbato, O., Guelfi, G., Barile, V. L., Menchetti, L., Tortiello, C., Canali, C., Brecchia, G., Traina, G., Beckers, J. F., and Melo de Sousa, N. 2017a. 'Using real-time PCR to identify pregnancy-associated glycoprotein 2 (PAG-2) in water buffalo (*Bubalus bubalis*) blood in early pregnancy', *Theriogenology*, 89: 106-13.

- Barbato, O., Menchetti, L., Sousa, N., Malfatti, A., Brecchia, G., Canali, C., Beckers, J.-F., and Barile, V. L. 2017b. 'Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) concentrations in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) during gestation and the postpartum period', *Theriogenology*, 97: 73-4.
- Barbato, O., Menchetti, L., Sousa, N., Brecchia, G., Malfatti, A., Canali, C., Beckers, J.-F., and Barile, V. L. 2018. 'Correlation of two radioimmunoassay systems for measuring plasma pregnancy-associated glycoproteins concentrations during early pregnancy and postpartum periods in water buffalo', *Reproduction In Domestic Animals*, 53: 1483-90.
- Barbato, O., Menchetti, L., Brecchia, G., and Barile, V. L. 2022. 'Using Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAGs) to Improve Reproductive Management: From Dairy Cows to Other Dairy Livestock. LID - 10.3390/ani12162033 [doi] LID - 2033', *Animals*: 10-12.
- Barfield, J. and Seidel, G. 2012. '311 superovulation of north american bison with two injections of follicle-stimulating hormone', *Reproduction, fertility, and development*, 25: 302-3.
- Batra, S., Arora, R., Bachlaus, N., and Pandey, R. 1979. 'Blood and Milk Progesterone in Pregnant and Nonpregnant Buffalo', *Journal of Dairy Science*, 62: 1390-93.
- Beckers, J.-F., Roberts, R., Zoli, A., Ectors, F., and Derivaux, J. 1994. 'Molécules de la famille des protéases aspartiques dans le placenta des ruminants: hormones ou protéines ?', *Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique*, 149: 355.
- Ben Dhafer, W. 2021. 'Paléogénomique de l'évolution des Bovinae et l'impact sur la domestication des bovins'. Thèse de doctorat défendue au service de Génétique des populations. Université Paris-Saclay - Paris-Saclay.
- Benoit, M., Veysset, P. 2021. 'Calcul des Unités Gros Bétails : proposition d'une méthode basée sur les besoins énergétiques pour affiner l'étude des systèmes d'élevage', *INRAE Productions Animales*, 34(2): 139–21.
- Beriot, M., Tchimbou, A., Barbato, O., Beckers, J.-F., and de Sousa, N. 2014. 'Identification of pregnancy-associated glycoproteins and alpha-fetoprotein in fallow deer (*Dama dama*) placenta', *Acta Veterinaria Scandinavica*: 56-4.
- Bharti, M., and Jacob, N. 2019. 'Laboratory and imaging techniques for pregnancy diagnosis in animals'. *Journal of Entomology and Zoology Studies*: 639-8.
- Blanton, D., White, P., Wallen, R., Auttelet, K., Stewart, A., Bramblett, A. 2015. 'The population, attributes, behavior, distribution, resource use and trends'. In: White, P., Wallen, R., Halleck, D. (Eds.), 'Yellowstone Bison: Conserving an American Icon in Modern Society'. The Yellowstone Association, Gardiner, Montana, United States of America: 1–18.
- Bocherens, H., Hofman-Kaminska, E., Drucker, D., Schmolcke, U., and Kowalczyk, R. 2015. 'European bison as a refugee species? Evidence from isotopic data on Early Holocene bison and other large herbivores in northern Europe', *PLOS One*, 10: e0115090.

- Brouillard, A., Davignon, L.-M., Cernik, R., Giguère, C.-E., Findlay, H., Juster, R.-P., Lupien, S., and Marin, M.-F. 2025. 'Comparing immunoassay and mass spectrometry techniques for salivary sex hormone analysis', *Psychoneuroendocrinology*, 174: 107379.
- Butler, J. , Hamilton, W. , Sasser, R. , Ruder, C. , Hass, G. , and Williams, R. 1982. 'Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins', *Biology of Reproduction*, 26: 925-33.
- Butler, J. 2000. 'Enzyme-linked immunosorbent assay', *Journal of Immunoassay*, 21: 165-44.
- Cahalane, V. 1944. 'Restoration of wild bison'. *Transactions of the North American, Wildlife Conference* 9: 135-8.
- Cardone, D., Caceres A., Sanhueza M., Cuello Carrión F., Roig Cerdeño M., Superina M., and Laconi M. 2026. 'Concentration-dependent effects of allopregnanolone on bovine pre-antral follicles in ovarian cortical tissue cultured in vitro'. *Theriogenology*, 249:117655.
- Cervantes, M. , Palomino, J., Anzar, M., Maplettoft, R. , and Adams, G. 2016. 'In vivo and in vitro maturation of oocytes collected from superstimulated wood bison (*Bison bison athabasca*) during the anovulatory and ovulatory seasons', *Animal Reproduction Science*, 173: 87-9.
- Chabi, K. and Lekha, S. 2022. 'Estradiol, Estrone and Ethinyl Estradiol Metabolism Studied by High Resolution LC-MS/MS Using Stable Isotope Labeling and Trapping of Reactive Metabolites', *Metabolites* 12(10): 931.
- Chethan, S. , Singh, S. , Nongsiej, J., Rakesh, H. , Singh, R. , Kumar, N., and Agarwal, S. 2014. 'IFN-tau acts in a dose-dependent manner on prostaglandin production by buffalo endometrial stromal cells cultured in vitro', *Reproduction in Domestic Animals*, 49: 403-8.
- Chouhan, V. , Dangi, S. , Gupta, M., Babitha, V., Khan, F. , Panda, R. , Yadav, V., Singh, G., and Sarkar, M. 2014. 'Stimulatory effect of vascular endothelial growth factor on progesterone production and survivability of cultured bubaline luteal cells', *Animal Reproduction Science*, 148: 251-59.
- Chucuri T., Monteiro J, Lima A., Bastos P., Souza V. Júnior J. 'Immunophenotyping of leukocytes in bovine placenta'. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54(2): 129-38.
- Clemens, J. and Estergreen, V. 1982. 'Metabolism and conjugation of [4-14C]progesterone by bovine liver and adipose tissues, in vitro'. *Steroids* 40(3):287-19.
- Conley, A. 2016. 'Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare', *Theriogenology*, 86: 355-65.
- Conley, A. , and Ball, B. 2019. 'Steroids in the establishment and maintenance of pregnancy and at parturition in the mare', *Reproduction*, 158: 197-11.

- Cotton, S., Clayton, C. , and Tropini, C. 2023. 'Microbial endocrinology: the mechanisms by which the microbiota influences host sex steroids', *Trends Microbiol*, 31: 1131-42.
- Crowther, J. 1995. 'ELISA. Theory and practice', *Methods in Molecular Biology*, 42: 1-218.
- Custer, E., Berardinelli, J., Short, R., Wehrman, M., Adair, R., 1990. 'Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first-calf suckled beef cows exposed to mature bulls', *Journal of Animal Science*, 68: 1370–7.
- Dalleszych, K., 2011. 'Some factors influencing reproductive parameters of European bison cows', *European Bison Conservation Newsletter*, 4: 45–9.
- Deayton, J. , Young, I. , and Thorburn, G. 1993. 'Early hypophysectomy of sheep fetuses: effects on growth, placental steroidogenesis and prostaglandin production', *Journal of reproduction and fertility*, 97: 513-20.
- Dessypris, A., 1975. 'Testosterone sulphate, its biosynthesis metabolism, measurement functions and properties'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 6, 1287-11.
- Detilleux, J., Arendt, J., Lomba, F., and Leroy, P. 1999. 'Methods for estimating areas under receiver-operating characteristic curves: illustration with somatic-cell scores in subclinical intramammary infections', *Preventive Veterinary Medicine*, 41: 75-13.
- Dlugash, G., Rauh, M., Carre, J.-M., Marcellus, A., Plachecki, S., and Schultheiss, O. 2025. 'Multicenter comparison of LC-MS/MS, radioimmunoassay, and ELISA for assessment of salivary cortisol and testosterone', *Psychoneuroendocrinology*: 107618.
- Dorn, C. 1995. 'Application of reproductive technologies in North American Bison (Bison bison)', *Theriogenology*, 43: 13-7.
- Duarte, R., Brandao, P. , and Duarte, A. 2023. 'Multidimensional chromatography in environmental analysis: Comprehensive two-dimensional liquid versus gas chromatography', *Journal of Chromatography A*, 1706: 464288.
- Dufour, P., Courtois, J., Seynaeve, Y., Peeters, S., Le Goff, C., Cavalier, E., and 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: 343-50.
- Dufour, P., Frisee, V., Rigaux, G., Brutinel, F., Egyptien, S., Bossaert, P., Deleersnyder, J., Deleuze, S., Peeters, S., Le Goff, C., Ponthier, J., and Cavalier, E. 2024. 'Analysis of progesterone and estrone-sulfate in feces of American Bison using liquid chromatography coupled to mass spectrometry: Technical validation and correlation with blood levels', *Domestic Animal Endocrinology*, 86: 106819.
- Dunn, W. , Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. , Halsall, A., Haselden, J. , Nicholls, A. , Wilson, I. , Kell, D. , Goodacre, R., and Human Serum Metabolome, Consortium. 2011. 'Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry', *Nature Protocols*, 6: 1060-83.

- Eley, R., Thatcher, W. , and Bazer, F. 1979. 'Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development', *ournal of Reproduction and Fertility*, 55(1): 181-90.
- Fernandez-Novoa, A., Pérez-Garnelo, S., Villagr , A., Pérez-Villalobos, N., and Astiz, S. 2020. 'The Effect of Stress on Reproduction and Reproductive Technologies in Beef Cattle- A Review', *Animals*, 10: 2096.
- Filho, R., Franco, G., Reese, S., Dantas, F., Fontes, P., Cooke, R., Rhinehart, J., Thompson, K., and Pohler, K. 2020. 'Using pregnancy associated glycoproteins (PAG) for pregnancy detection at day 24 of gestation in beef cattle', *Theriogenology*, 141: 128-33.
- Flocchini J., 2015. 'Characteristics and behavior of the American Bison. In: The Bison Producer's Handbook', second edition. National Bison Association, Westminster, Colorado, United States of America: 47-7.
- Forgacs, D., Wallen, R. , Boedeker, A. , and Derr, J. 2019. 'Evaluation of fecal samples as a valid source of DNA by comparing paired blood and fecal samples from American bison (Bison bison)', *BMC Genetics*, 20: 22.
- Fraenkel, L., and F. Cohn. 1901. 'Experimentelle untersuchungen des corpus luteum auf die insertion des eies (Theorie von Born)', *Anatomischer Anzeiger*, 20: 294-6.
- French, D. 2016. 'Advances in Bioanalytical Techniques to Measure Steroid Hormones in Serum', *Bioanalysis*, 8: 1203-19.
- Frisee, V., Rigaux, G., Dufour, P., Barbato, O., Brutinel, F., Egyptien, S., Bossaert, P., Deleuze, S., Cavalier, E., and Ponthier, J. 2022. 'American Bison (Bison bison) reproductive endocrinology: serum Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG), Progesterone, Estrone and Estrone-Sulfate in non pregnant animals and during gestation', *Domestic Animal Endocrinology*, 78: 106684.
- Frisee, V., Rigaux, G., Dufour, P., Brutinel, F., Bossaert, P., Egyptien, S., Barbato, O., Farnir, F., Le Goff, C., Deleuze, S., Cavalier, E., and Ponthier, J. 2025. 'Diagnosing american bison pregnancy during its two last trimesters: Comparison between rectal palpation associated with ultrasonography and hormonal assays in serum or in feces', *Animal Reproduction Science*, 272: 107660.
- Gabrilovac, J., Kadjelovic; J., Osmak, M., Suchanek, E., Zupanovic, Z., Boranic, M. 1988. 'NK cell activity and oestrogen hormone levels during normal human pregnancy', *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 25: 165-7.
- Garcia-Ispuerto, I., Almeria, S., Serrano, B., de Sousa, N. M., Beckers, J. F., and Lopez-Gatius, F. 2013. 'Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoproteins measured using anti-bovine PAG-2 antibodies on day 120 of gestation predict abortion in dairy cows naturally infected with Neospora caninum', *Reproduction in Domestic Animals*, 48: 613-8.

- Geyer, J., Bakhaus, K., Bernhardt, R., Blaschka, C., Dezhkam, Y., Fietz, D., Grosser, G., Hartmann, K., Hartmann, M.-F., Neunzig, J., Papadopoulos, D., Sanchez-Guijo, A., Scheiner-Bobis, G., Schuler, G., Shihan, M., Wrenzycki, C., Wudy, S. A., and Bergmann, M. 2017. 'The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 172: 207-21.
- Godfroid, J., Nielsen, K., and Saegerman, C. 2010. 'Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife', *Croatian Medical Journal*, 51: 296-9.
- Gokuldas, P., Yadav, M., Kumar, H., Singh, G., Mahmood, S., and Tomar, A. 2010. 'Resumption of ovarian cyclicity and fertility response in bull-exposed postpartum buffaloes', *Animal Reproduction Science*, 121: 236-41.
- Goldsmith, S. 1975. 'Radioimmunoassay: review of basic principles', *Seminars in Nuclear Medicine*, 5: 125-52.
- Grange, T., Brugal, J.-P., Flori, L., Gautier, M., Uzunidis, A., and Geigl, E.-M. 2018. 'The Evolution and Population Diversity of Bison in Pleistocene and Holocene Eurasia: Sex Matters', *Diversity*, 10: 65.
- Green, W. , and Rothstein, A. 1991. 'Trade-offs between growth and reproduction in female bison', *Oecologia*, 86: 521-27.
- Greenwood, F. , Hunter, W. , and Glover, J. 1963. 'The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity', *Biochemical Journal*, 89: 114-23.
- Gross, E., & Wang, G. 2005. 'Effects of Population Control Strategies on Retention of Genetic Diversity in National Park Service Bison (*Bison bison*) Herds'. Departement of Biology Montane State University: 3- 38.
- Gross, J. 2011. 'Mass Spectrometry'. ISBN: 978-3-642-10709-2 Ed; Springer. Berlin, Deutschland
- Grow, D. 2002. 'Metabolism of endogenous and exogenous reproductive hormones', *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 29: 425-36.
- Grunert, E., Ahlers, D., and Heuwieser, W. 1989. 'The role of endogenous estrogens in the maturation process of the bovine placenta', *Theriogenology*, 31: 1081-91.
- Hähnel, R., Twaddle, E., and Ratajczak, T. 1973. 'The specificity of the estrogen receptor of human uterus', *Journal of Steroid Biochemistry*, 4: 21-31.
- Haidt, A., Kaminski, T., Borowik, T., and Kowalczyk, R. 2018. 'Human and the beast-Flight and aggressive responses of European bison to human disturbance', *PLOS ONE*, 13.
- Haines, F. 1995. '*The buffalo : the story of American bison and their hunters from prehistoric times to the present*'. University of Oklahoma Press: Norman ; London.

- Harl, A., Negrón-Pérez V., Stewart J., Perry G., Ealy A. and Rhoads M. 2025. 'Maturation of bovine cumulus oocyte complexes in follicular fluid with or without estradiol, progesterone or the combination affects cumulus cell expansion and blastocyst development', *PLOS One*, 20(6): 16
- Haugejorden, G., Waage, S., Dahl, E., Karlberg, K., Beckers, J.-F., and Ropstad, E. 2006. 'Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring', *Theriogenology*, 66: 1976-84.
- Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., and Madiraju, C. 2023. 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications', *Methods in Molecular Biology*, 2612: 1-17.
- Hein, K. and Allrich, R. 1992. 'Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrous behavior in cattle', *Journal of animal science*, 70: 243-4.
- Helbig, L., Woodbury, M., Haigh, J., Collins, J., and Barth, A. 2007. 'The seasonal fertility of North American bison (*Bison bison*) bulls', *Animal Reproduction Science*, 97: 265-77.
- Henricks, D. , Dickey, J. , Hill, J. , and Johnston, W. 1972. 'Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows', *Endocrinology*, 90: 1336-42.
- Hendricks, D. 1976. 'Estrogen concentrations in bovine and porcine tissues', *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1: 617-39.
- Hirako, M., Takahashi, T., and Domeki, I. 2002. 'Peripheral changes in estrone sulfate concentration during the first trimester of gestation in cattle: comparison with unconjugated estrogens and relationship to fetal number', *Theriogenology*, 57: 1939-47.
- Hložek, T., Bosáková, T., Bosáková, Z., and Tůma, P. 2022. 'Hydrophobic eutectic solvents for endocrine disruptors purification from water: Natural and synthetic estrogens study', *Separation and Purification Technology*, 303: 122310.
- Hoffmann, B., Goes de Pinho, T., and Schuler, G. 1997. 'Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 105: 296-7.
- Hoffmann, B., and Schuler, G. 2002. 'The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation', *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 309-20.
- Hollenstein, K., Janett, F., Bleul, U., Hassig, M., Kahn, W., and Thun, R. 2006. 'Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress', *Animal Reproduction Science*, 93: 292-10.
- Hopper, R. 2021. 'Bovine reproduction', Wiley-Blackwell: Hoboken, New Jersey, United States of America.

- Hughes, C., Hellmers, A., da Silva, M., Ott, T., and Pate, J. 2025. 'Interferon tau-dependent and -independent changes in the bovine corpus luteum of early pregnancy', *Biology of Reproduction*, 112: 1213-28.
- Humblot, P. 1988. 'Proteins specific for pregnancy in ruminants', *Reproduction Nutrition Development*, 28: 1753-9.
- Hung, N. , and Prakash, B. 1990. 'Influence of gestation on blood plasma concentrations of oestrone and oestrone sulphate in Karan Swiss cows and Murrah buffaloes', *British Veterinary Journal*, 146: 449-56.
- Illera, J. , Silvan, G., Munro, C. , Lorenzo, P. , Illera, M. , Liu, I., and Illera, M. 2003. 'Amplified androstenedione enzymeimmunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse: comparison with testosterone and estrone sulphate methods', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84: 377-82.
- IUCN. 2025. 'The IUCN Red List of Threatened Species', Version 2025-2. <https://www.iucnredlist.org>. consulté le 29 November 2025
- Isobe, N., Nakao, T., Uehara, O., Yamashiro, H., and Kubota, H. 2003. 'Plasma concentration of estrone sulfate during pregnancy in different breeds of Japanese beef cattle', *Journal of Reproduction and Development*, 49: 369-74.
- Izhar, M., Pasmanik, M., and Shemesh, M. 1992. 'Bovine placental progesterone synthesis: comparison of first and second trimesters of gestation', *Biology of Reproduction*, 46: 846-52.
- Janssens, S., Casier, H., & Vervaecke, H. 2022. 'La consanguinité chez les bisons Américains: essai méthodologique'. Présentation orale lors d'une assemblée d'éleveurs. Recogne, Belgique
- JaŚkowski, J., Kaczmarowski, M., Kulus, J., JaŚkowski, B., Herudzińska, M., and Gehrke, M. 2019. 'Rectal palpation for pregnancy checks in cows – the past or an alternative to modern diagnostic methods', *Medycyna Weterynaryjna*, 75: 6156-2019.
- Johnson, G., Dunlap, K., Erikson, D., Reed, K., White F., Burghardt, R. and Bayless, K. 2007. 'The sheep conceptus differentially regulates uterine secreted phosphoprotein 1 that correlates with increased histotrophic and hematotrophic support of pregnancy', *Biology of Reproduction*, 77: 103-103.
- Johnson, G., Spencer, A., Burghardt, R., Taylor, K., Gray, C. and Bazer, F. 2000. 'Progesterone Modulation of Osteopontin Gene Expression in the Ovine Uterus', *Biology of Reproduction*, 62: 1315-6.
- Johnston, C. 2010. 'Bison Production In The United States', <https://www.thecattlesite.com/articles/2337/bison-production-in-the-us>. Consulté le 10 avril 2025.
- Juniewicz, P. , and Johnson, B. 1980. 'Episodic fluctuation of total estrogens in peripheral blood of bulls: effects of estradiol-17 beta on LH and testosterone secretion', *Biology of Reproduction*, 23: 1029-37.

- Jyoti, J. 2023. Radioimmunoassay: Define with simple diagrams : <https://sciencequery.com/radioimmunoassay-define-with-simple-diagrams/> consulté le 22 mai 2026
- Kamrath, C., Wudy, S. , and Krone, N. 2014. 'Steroid biochemistry', *Endocrine Development*, 27: 41-52.
- Kapke, C. , Arcese, P., Ziegler, T., and Scheffler, G. 1999. 'Estradiol and progesterone metabolite concentration in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) feces', *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30: 361-71.
- Kiewisz, J., Melo de Sousa, N., and Beckers, J.-F. 2006. 'Pregnancy-Associated Glycoprotein 74 [Fragment] from Bison bison placenta - Access number P84917', *Swiss-Prot*.
- Kiewisz, J., Sousa, N. , Beckers, J.-F., Vervaecke, H., Panasiewicz, G., and Szafranska, B. 2008. 'Isolation of pregnancy-associated glycoproteins from placenta of the American bison (*Bison bison*) at first half of pregnancy', *General and Comparative Endocrinology*, 155: 164-75.
- Kiewisz, J., Melo de Sousa, N., Beckers, J.-F., Panasiewicz, G., Gizejewski, Z., and Szafranska, B. 2009. 'Identification of multiple pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) purified from the European bison (*B. b. bonasus* L.) placentas', *Animal Reproduction Science*, 112: 229-50.
- Kim, M., Park, H., Seol, J., Jang, J., Cho, Y., Kim, K., Choi, Y., Lydon, J., Demayo, F., Shibuya, M., Ferrara, N., Sung, H., Nagy, A., Alitalo, K. and Koh, G. 2013. 'VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy', *EMBO Molecular Medicine*, 5(9): 1415-15.
- Kirkpatrick, J.-F., Kincy, V., Bancroft, K., Shideler, S. E., and Lasley, B. 1991. 'Oestrous cycle of the North American bison (*Bison bison*) characterized by urinary pregnanediol-3-glucuronide', *Journal of Reproduction and Fertility*, 93: 541-7.
- Kirkpatrick, J.-F., Bancroft, K., and Kincy, V. 1992. 'Pregnancy and ovulation detection in bison (*Bison bison*) assessed by means of urinary and fecal steroids', *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 590-7.
- Kirkpatrick, J.-F., Gudermuth, D. , Flagan, R. , McCarthy, J. , and Lasley, B. 1993. 'Remote Monitoring of Ovulation and Pregnancy of Yellowstone Bison', *The Journal of Wildlife Management*, 57: 407-12.
- Kline, A. , Menegatti Zoca, S., Epperson, K. , Quail, L. , Ketchum, J. , Andrews, T. , Rich, J., Rhoades, J. , Walker, J. , and Perry, G. 2024. 'Evaluation of pregnancy associated glycoproteins assays for on farm determination of pregnancy status in beef cattle', *PLOS ONE*, 19: e0306325.
- Knight, C. 1835. 'The Penny Cyclopædia of the Society for the Diffusion of Useful Knowledge'. Society for the Diffusion of Useful Knowledge, London, Great Britain.
- Koren, L., Ng, E. , Soma, K. , and Wynne-Edwards, K. 2012. 'Sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for multiple steroids in mammalian and avian circulation', *PLOS ONE*, 7: e32496.

- Koskivuori, J., Voutilainen, R., Uusitalo, L., Lehtonen, M., Lakka, T., Auriola, S., and Häkkinen, M. 2022. 'A quantitative ultra-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry analysis of steroids from human scalp hair', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 215: 114768.
- Kowalczyk, G., and Hernandez-Blanco, J.A. . 2020. 'Bison bonasus', <https://www.iucnredlist.org/fr/species/2814/45156279Plumb>. Consulté le 30 avril 2025.
- Krasińska, M., and Krasiński, Z. 2013. '*European Bison*', Ed : Springer Berlin, Heidelberg, Deutschland.
- Krasinski, Z., Raczynski, J., 1967. 'The Reproduction Biology of European Bison Living in Reserves and in Freedom', *Acta Theriologica* 12: 407–37.
- Krishnakumar, S., Whiteside, D., Elkin, B., and Thundathil, J. 2015. 'Effect of Reproductive Seasonality on Gamete Quality in the North American Bison (*Bison bison bison*)', *Reproduction in Domestic Animals*, 50: 206-13.
- Kumar, A., Mehrotra, S., Dangi S., Singh, G., Chand, S., Singh, L., Mahla, A., Kumar, S., and Nehra, K.. 2013. 'Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals'. *Veterinary World*, 6: 59.
- Lakomy, D., and Olsson, N.-O. 2008. 'Apport du multiplexage en pratique diagnostique immunologique', *Revue Francophone des Laboratoires*, 2008: 59-7.
- Lämmerhoffer, M., Maier, N., and Lindner, W. 2010. 'Introduction to Modern Liquid Chromatography', *Enantiomer Separations*. Ed: John Wiley & Sons, Inc ISBN:9780470167540. Hoboken, New Jersey, United States of America: 665-724.
- Lammers, D. 2015. 'Large Scale Bison Management. In: The Bison Producer's Handbook', second edition. National Bison Association, Westminster, Colorado, United States of America : 91-7.
- Ledeck, J., Dufour, P., Evrard, E., Le Goff, C., Peeters, S., Brutinel, F., Egyptien, S., Deleuze, S., Cavalier, E., and Ponthier, J. 2022. 'Evolution of 17-beta-estradiol, estrone and estrone-sulfate concentrations in late pregnancy of different breeds of mares using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry', *Theriogenology*, 189: 86-91.
- Lemley, C., Vonnahme, K., Tager, L., Krause, K., Wilson, M., 2010a. 'Diet-induced alterations in hepatic progesterone (P4) catabolic enzyme activity and P4 clearance rate in lactating dairy cows'. *Journal of Endocrinology*, 205: 233-8.
- Lemley, C., Wilmoth, T., Tager, L., Krause, K., Wilson, M., 2010b. 'Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows'. *Journal of Dairy Science*, 93: 1012–9.
- Lewiecki, E. , Bilezikian, J. , Carey, J. , Dell, R. , Gordon, C. , Harris, S. , McClung, M. , Miller, P. , and Rosenblatt, M. 2018. 'Proceedings of the 2017 Santa Fe Bone Symposium: Insights and Emerging Concepts in the Management of Osteoporosis', *Journal of Clinical Densitometry*, 21: 3-21.

- Licht, D. 2017. 'Bison Conservation in Northern Great Plains National Parks: No Need to Panic'. *Great Plains Research*, 27: 83-9.
- Licht, D. , and Johnson, D. 2018. 'Influences of Precipitation on Bison Weights in the Northern Great Plains', *Rangelands*, 40: 115-23.
- Liggins G., Thorburn G. 1994. 'Initiation of Parturition. In: Lamming GE, editor. Marshall's physiology of reproduction' Pregnancy and lactation. Ed: Chapman & Hall London, Great Britain: 863–139.
- Lister, A.. 2005. 'Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis.' *Separation Science and Technology*, 6: 191-26
- Litwack, G. 2022. Chapter 16 - Steroid Hormones in Human Biochemistry (Second Edition). Academic Press, Boston, Unites States of America: 517-41.
- Longcope, C., 1972. 'The metabolism of estrone sulfate in normal males'. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 34: 113-9.
- Longtin, J., Serhir, B., Dufresne, P., Boivin, E., Corbeil, F., Bekal, S., Moreira, S., and Doming, M.-C. 2018. 'Vérification et validation des méthodes analytiques', Ed : Institut national de santé publique du Québec. Québec, Canada.
- Lotfan, M., Choudhary, S., Yadav, M. L., Tripathi, I., Bhan, S. S., Bathla, S., Rawat, P., Kumar, S., Mohanty, T. K., Kaushik, J. K., and Mohanty, A. K. 2019. 'Characterization of buffalo native pregnancy-associated glycoprotein: mass spectrometry-based glycan composition analysis, sugar-binding characteristics and proteolytic activity assay', *Journal of Proteins and Proteomics*, 10: 23-9.
- Lott, D. 2002. 'American Bison : A Natural History' First edition. University of California Press. California, United-States: 245
- Love, D. , Mefford, M. , and Ramer, J. 2017. 'Validation of the BioPRYN enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pregnancy-specific protein-B (PSPB) and diagnosis of pregnancy in American bison (*Bison bison*)', *Reproduction in Domestic Animals*, 52: 791-97.
- Magnus, V. 1901. 'Ovariets betydning for svangerskabet med saerligt hensyntil corpus luteum', *Norsk Magazin for Laegevidenskaben*, 62:1138-4.
- Maienschein, J. , and Laubichler, M. D. 2010. 'Embryo project encyclopedia', *Journal of the History of Biology*, 43(1): 1-16.
- Markova, A., Puzachenko, A., van Kolschoten, T., Kosintsev, P., Kuznetsova, T., Tikhonov, A., Bachura, O., Ponomarev, D., van der Plicht, J., and Kuitens, M. 2015. 'Changes in the Eurasian distribution of the musk ox (*Ovibos moschatus*) and the extinct bison (*Bison priscus*) during the last 50 ka BP', *Quaternary International*, 378: 99-111.

- Martal, J., Chêne, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., L'Haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M. and Chaouat, G. 1997. 'Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy', *Reproduction Fertility and Development*, 9(3): 355-25.
- Martínez-Navarro, B., Rook, L., Papini, M., and Libsekal, Y. 2010. 'A new species of bull from the Early Pleistocene paleoanthropological site of Buia (Eritrea): Parallelism on the dispersal of the genus *Bos* and the Acheulian culture', *Quaternary International*, 212: 169-75.
- Matsuda, D. , Bellem, A. , Gartley, C. , Madison, V., King, W. , Liptrap, R. , and Goodrowe, K. 1996. 'Endocrine and behavioral events of estrous cyclicity and synchronization in wood bison', *Theriogenology*, 45: 1429-41.
- McCorkell, R. , Woodbury, M. , and Adams, G. 2013a. 'Serial ovarian ultrasonography in wild-caught wood bison (*Bison bison athabasca*)', *Theriogenology*, 80: 552-6.
- McCorkell, R., Wynne-Edwards, K., Galbraith, J., Schaefer, A., Caulkett, N., Boysen, S., Pajor, E., and of, Ucvn Class. 2013b. 'Transport versus on-farm slaughter of bison: physiological stress, animal welfare, and avoidable trim losses', *Canadian Veterinary Journal*, 54: 769-74.
- Meagher, M. 1973. 'The bison of Yellowstone national park'. https://www.nps.gov/parkhistory/online_books/bison/index.htm. Consulté le 22 mai 2025.
- Medina. K., Strasser, A., Kincade, P. 2000. 'Oestrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors', *Blood*, 95: 2059-8.
- Mellin, T. , and Erb, R. 1965. 'Estrogens in the Bovine--a Review', *Journal of Dairy Science*, 48: 687-13.
- Melmed, S., Auchus, R., Goldfine, A., Rosen, C., and Kopp, P. 2024. '*Williams Textbook of Endocrinology*' E-Book Ed : Elsevier. Amsterdam, Netherlands.
- Merrer, J. 2022. 'Les sources d'erreurs et de variabilité dans les études épidémiologiques', *Sages-Femmes*, 21: 51-4.
- Messier, F., Desaulniers, D. , Goff, A. , Nault, R., Patenaude, R., and Crete, M. 1990. 'Caribou Pregnancy Diagnosis from Immunoreactive Progestins and Estrogens Excreted in Feces', *The Journal of Wildlife Management*, 54: 279-83.
- Meunier, M., Schwarzenberger, F., and Mulo, B. 2022. 'Use of a simplified non-invasive technic to monitor fecal progesterone metabolites and reproduction function in several zoo species: Efficacy of mini VIDAS(R) automate (bioMerieux)', *Theriogenology*, 179: 69-8.
- Meyer, H., 1994. 'Luteal versus placental progesterone: the situation in the cow, pig and bitch', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 102: 190-2.
- Minnesota Bison Association 2025. 'Bison Basics Handbook': <https://mnbison.org/raising-bison>. Consulté le 9 septembre 2025

- Mkarem, L. , Batika, M. , and Bitar, R. 2025. 'New hope in treating progressive familial intrahepatic cholestasis in children', *World Journal of Hepatology*, 17: 108253.
- Moenter, S. , Webel, S. , and Dziuk, P. 1992. 'Pregnancy detection and litter size classification by estrone sulfate measurements in swine under farm conditions', *Animal Reproduction Science*, 27: 161-67.
- Moss, G. 1989. 'Nomenclature of steroids (Recommendations 1989)', *Pure and Applied Chemistry*, 61: 1783-822.
- Mostl, E., Choi, H. , Wurm, W., Ismail, N., and Bamberg, E. 1984. 'Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 alpha in faeces', *British Veterinary Journal*, 140: 287-91.
- Ncube, H., Duncan, P., Grange, S., Cameron, E., Barnier, F., and Ganswindt, A. 2011. 'Pattern of faecal 20-oxopregnane and oestrogen concentrations during pregnancy in wild plains zebra mares', *General and Comparative Endocrinology*, 172: 358-62.
- Nebel, R. 1988. 'On-Farm Milk Progesterone Tests', *Journal of Dairy Science*, 71: 1682-90.
- Nguyen, V. , Barbato, O., Bui, X. , Beckers, J.-F., and de Sousa, N. 2012. 'Assessment of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentrations in swamp buffalo samples from fetal and maternal origins by using interspecies antisera', *Animal Science Journal*, 83: 683-9.
- Nickoloff, B. 2021 'Bison, Tribes, and Brucellosis in the Interagency Bison Management Plan', Sustainable Development Law & Policy: Vol. 22(1): Article 5.
- Nielsen, K., Smith, P., Yu, W. , Elmgren, C., Halbert, G., Nicoletti, P., Perez, B., Conde, S., Samartino, L., Nicola, A., Bermudez, R., and Renteria, T. 2008. 'Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals', *Veterinary Immunology and Immunopathology Journal*, 125: 246-50.
- Oakey, R. 1971. 'Estrogen and Progesterone Production in Human Pregnancy.' *Vitamins & Hormones*, 28: 1-36.
- Ohtaki, T., Moriyoshi, M., Nakada, K., and Nakao, T. 1999. 'Fecal estrone sulfate profile in sows during gestation', *Journal of Veterinary Medical Science*, 61: 661-5.
- Oleneva, E., Khaydukova, M., Ashina, J., Yaroshenko, I., Jahatspanian, I., Legin, A., Kirsanov, D. 2019. 'A Simple Procedure to Assess Limit of Detection for Multisensor Systems'; *Sensors*, 19(6):1359.
- Olsen, S. 2010. 'Brucellosis in the United States: role and significance of wildlife reservoirs'. *Vaccine*, 28(5): 73-3.
- Othen, L. , Bellem, A. , Gartley, C. , Auckland, K., King, W. , Liptrap, R. , and Goodrowe, K. 1999. 'Hormonal control of estrous cyclicity and attempted superovulation in wood bison (*Bison bison athabasca*)', *Theriogenology*, 52: 313-23.

- Ousey, J. 2004. 'Peripartal endocrinology in the mare and foetus', *Reproduction in Domestic Animals*, 39: 222-31.
- Palomino, J., Cervantes, M., Woodbury, M., Maplettoft, R. and Adams, G. 2017. 'Effects of eCG and progesterone on superovulation and embryo production in wood bison (*Bison bison athabasca*)'. *Animal Reproduction Science*, 181: 41-8.
- Pappano, D., Roberts E., and Beehner. J. 2010. 'Testing extraction and storage parameters for a fecal hormone method', *American Journal of Primatology*, 72: 934–7.
- Parida, S., and Sharma, D. 2019. 'The Microbiome-Estrogen Connection and Breast Cancer Risk', *Cells*, 8: 1642.
- Perenyi, Z. , Szenci, O., Sulon, J., Drion, P. V., and Beckers, J.-F. 2002. 'Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma', *Reproduction in Domestic Animals*, 37: 100-4.
- Peris, S. , Bilodeau, J. , Dufour, M., and Bailey, J. 2007. 'Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm', *Molecular Reproduction & Development*, 74: 878-92.
- Peter, I., Haron, A.,Jesse, F., Ajat, M., Han, H., Fitri, W., Yahaya, M. and Alamaary; M. 2018. 'Opportunities and challenges associated with fecal progesterone metabolite analysis'. *Veterinary World*, 11(10):1466-6.
- Pfeiffer-Deml, T. 1998. 'Capreolus suessenbornensis Kahlke 1956 (Cervidae, Mammalia) aus den Mosbach-Sanden (Wiesbaden-Biebrich)', *Mainzer Naturwissenschaftliches Archiv*, 36: 47-29.
- Phippen, J. 2016. 'Kill Every Buffalo You Can! Every Buffalo Dead Is an Indian Gone', <https://www.theatlantic.com/national/archive/2016/05/the-buffalo-killers/482349/>. Consulté le 27 Juin 2025.
- Ponter, A., Remy, D. and Grimard, B. 2013. 'Prévention nutritionnelle des problèmes de reproduction chez la vache laitière'. *Point Vétérinaire Numéro spécial*: 9
- Ponthier, J., Franck, T., Detilleux, J., Mottart, E., Serteyn, D., and Deleuze, S. 2010. 'Association between myeloperoxidase concentration in equine frozen semen and post-thawing parameters', *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 811-6.
- Praither, J. 1985. 'Basic Principles of Radioimmunoassay Testing: A Simple Approach', *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 13: 34.
- Price, T. 2006. 'Retracing the Aurochs: History, Morphology and Ecology of an Extinct Wild Ox. By Cis van Vuure', *The Quarterly Review of Biology*, 81: 272-72.
- Pucek, Z. , Belousova, I., Krasińska, M, and Olech, W. 2002. 'European bison *Bison bonasus*: Current state of the species and an action plan for its conservation', Ed : Editions du conseil de l'Europe. ISBN 978-92-871-5549-8. Strasbourg, France: 82.

- Pugeat, M. 2021. 'Déterminisme sexuel, différenciation gonadique et identité du genre', *In Analysis*, 5: 54-7.
- Pugliesi, G., Miagawa, B. , Paiva, Y. , Franca, M. , Silva, L. , and Binelli, M. 2014. 'Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy?', *Biology of Reproduction*, 91: 95.
- Rabiee, A. , Macmillan, K. , Schwarzenberger, F., and Wright, P. 2002. 'Effects of level of feeding and progesterone dose on plasma and faecal progesterone in ovariectomised cows', *Animal Reproduction Science*, 73: 185-95.
- Raeside, J. 1983. 'The formation of unconjugated and sulfoconjugated estrogens by Leydig cells of the boar testis', *Biochemistry and Cell Biology*, 61: 790-5.
- Reese, S. , Pereira, M. , Edwards, J. , Vasconcelos, J. , and Pohler, K. 2018. 'Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation', *Theriogenology*, 106: 178-85.
- Ricci, A., Carvalho, P. , Amundson, M. , Fourdraine, R. , Vincenti, L., and Fricke, P. 2015. 'Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis', *Journal of Dairy Science*, 98: 2502-14.
- Rio Feltrin, I., Guimarães da Silva, A., Rocha, C., Ferraz, P., da Silva Rosa M., Martins, T., Coelho da Silveira, J., Oliveira, M., Binelli, M., Pugliesi, G. and Membrive C. 2024. 'Effects of 17 β -estradiol on the uterine luteolytic cascade in bovine females at the end of diestrus'. *Theriogenology*, 213: 1-10.
- Robbins, J. 2023. 'Mass Yellowstone Hunt Kills 1,150 Bison', <https://www.nytimes.com/2023/04/04/science/bison-hunt-yellowstone-native-americans.html>. Consulté le 27 Juin 2025.
- Roboz, J. 2014. 'Mass spectrometry for the novice (1^{ère} edition)'. Ed: CRC Press. ISBN : 9780429195440. Boca Raton, Florida, United States of America: 309
- Roelen, B. 2019. 'Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence', *Reproduction Fertility and Development*, 32(2): 98-5.
- Rogers, L., and Ranglack, D. 2022. 'Bison bison (Green Status assessment)', <https://www.iucnredlist.org/species/2815/123789863>. Consulté le 30 avril 2025.
- Ropstad, E., Veiberg, V., Sakkinen, H., Dahl, E., Kindahl, H., Holand, O., Beckers, J.-F., and Eloranta, E. 2005. 'Endocrinology of pregnancy and early pregnancy detection by reproductive hormones in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*)', *Theriogenology*, 63: 1775-88.
- Ruder J., Loriaux L. and Lipsett M. 1972. 'Estrone sulfate : production rate and metabolism in man'. *Journal of Clinical Investigation*, 51, 1020-13.

- Safar-Hermann, N., Ismail, M. , Choi, H. , Möstl, E., and Bamberg, E. 2005. 'Pregnancy diagnosis in zoo animals by estrogen determination in feces', *Zoo Biology*, 6: 189-93.
- Sarkar, S. 2012. 'Fetal age determination in Murrah buffaloes from days 22 through 60 with ultrasonography', *The Indian journal of animal sciences*, 82: 374-76.
- Sasser, R., Ruder, C. , Ivani, K. , Butler, J. , and Hamilton, W. 1986. 'Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation', *Biology of Reproduction*, 35(4): 936-42.
- Satterfield, M., Hayashi, K., Song, G., Black, S., Bazer, F. and Spencer, T. 2008. 'Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the ovine uterus', *Biology of Reproduction*, 79(6): 1226-10.
- Scarnecchia, D. 1985. 'The animal-unit and animal-unit-equivalent concepts in range science'. *Journal of Range Management*, 38: 346-3.
- Schoenecker, K. , Lyda, R. , and Kirkpatrick, J. 2004. 'Comparison of three fecal steroid metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*)', *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 273-81.
- Schuler, G., Greven, H., Kowalewski, M. , Doring, B., Ozalp, G. , and Hoffmann, B. 2008. 'Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation?', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes Diabetes*, 116: 429-36.
- Schuler, G., Furbass, R., and Klisch, K. 2018. 'Placental contribution to the endocrinology of gestation and parturition', *Animal Reproduction*, 15: 822-42.
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme R. and Bamberg, E. 1996. 'Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals'. *Animal Reproduction Science*, 42(1): 515-11.
- Schwarzenberger, F., Palme, R., Bamberg, E. and Möstl, E. 1997. 'A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function'. *Mammalian Biology*, 62: 214-7.
- Schwarzenberger, F., Rietschel, W., Vahala, J., Holeckova, D., Thomas, P., Maltzan, J., Baumgartner, K., Schaftenaar, W. 2000. 'Fecal Progesterone, Estrogen, and Androgen Metabolites for Noninvasive Monitoring of Reproductive Function in the Female Indian Rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*', *General and Comparative Endocrinology*, 119: 300-7.
- Senger, P. 2015. 'Pathways to pregnancy and parturition (3^{ème} édition)'. Ed: Current Conceptions Inc, ISBN: 978-0965764834. Pullman, Washington, United States of America: 381

- Serrano-Perez, B., Hansen, P., Mur-Novales, R., Garcia-Ispuerto, I., de Sousa, N., Beckers, J.-F., Almeria, S., and Lopez-Gatius, F. 2016. 'Crosstalk between uterine serpin (SERPINA14) and pregnancy-associated glycoproteins at the fetal-maternal interface in pregnant dairy heifers experimentally infected with *Neospora caninum*', *Theriogenology*, 86: 824-30.
- Shah, K., Nakao, T., and Kubota, H. 2006. 'Plasma estrone sulphate (E1S) and estradiol-17beta (E2beta) profiles during pregnancy and their relationship with the relaxation of sacrosciatic ligament, and prediction of calving time in Holstein-Friesian cattle', *Animal Reproduction Science*, 95: 38-15.
- Shah, K., Nakao, T., Kubota, H., and Maeda, T. 2007. 'Peripartum changes in plasma estrone sulfate and estradiol-17beta profiles associated with and without the retention of fetal membranes in holstein-friesian cattle', *Journal of Reproduction and Development*, 53: 279-88.
- Shahin, M., Friedrich, M., Gauly, M., and Holtz, W. 2014. 'Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) profile of Holstein-Friesian cows as compared to dual-purpose and beef cows', *Reproduction in Domestic Animals*, 49: 618-20.
- Sharma, V., Kaur, P., Aulakh, R., Sharma, R., Verma, R., and Singh, B. 2024. 'Is *Brucella* excreted in cattle faeces? - Evidence from Punjab, India', *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 104: 102099.
- Shaw, J., Carter, T., 1989. 'Calving Patterns among American Bison', *The Journal of Wildlife Management*, 53: 896–2.
- Shemesh, M. 1990. 'Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review', *Reproduction Fertility and Development*, 2: 129-35.
- Shemesh, M., Harel-Markowitz, E., Gurevich, M., and Shore, L. S. 1994. 'Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells', *Biology of Reproduction*, 51: 146-51.
- Shipka, M., and Ellis, L. 1998. 'No effects of bull exposure on expression of estrous behavior in high-producing dairy cows¹This research was supported by the Utah Agricultural Experiment Station', *Applied Animal Behaviour Science*, 57: 1-7.
- Singh, S., Ramachandran, N., Sharma, N., Goel, A., Gururaj, K., and Kharche, S. 2019. 'Temporal changes in plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein, progesterone and estrone sulfate associated with fetal number during early- and mid-pregnancy in goats', *Animal Reproduction Science*, 205: 115-25.
- Sitruk-Ware, R. 2018. 'Non-clinical studies of progesterone', *Climacteric*, 21: 315-20.
- Skelley, D., Brown, L., and Besch, P. 1973. 'Radioimmunoassay', *Clinical Chemistry*, 19: 146-86.
- Soroka, C., Ballatori, N., and Boyer, J. 2010. 'Organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta: its role in bile acid transport and cholestasis', *Seminars in Liver Disease*, 30: 178-85.

- Sousa, N. , Remy, B., El Amiri, B., De Figueiredo, J. , Banga-Mboko, H., Dias Goncalves, P. and Beckers, J.-F. 2002. 'Characterization of pregnancy-associated glycoproteins extracted from zebu (*Bos indicus*) placentas removed at different gestational periods', *Reproduction Nutrition Development*, 42: 227-41.
- Sousa, N., Ayad, A., Beckers, J. F. and Gajewski, Z. 2006. 'Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants'. *Journal of Physiology and Pharmacology* 57(8): 153-18.
- Srivastava, A., Godbole, M. and Shrivastava, A. 2022. 'Estimation of Steroid Hormones in Biological Samples Using Micro Extraction and Advanced Chromatography Techniques', *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 9.
- Swanson, W. 2023. 'The challenge of assisted reproduction for conservation of wild felids - A reality check', *Theriogenology*, 197: 133-38.
- Szelenyi, Z., Balogh, O., Lopez-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I., Kriko, E., and Gabor, G. 2018. 'Is twin pregnancy, calving and pregnancy loss predictable by serum pregnancy-specific protein b (pspb) concentration 28-35 days after ai in dairy cows?', *Acta Veterinaria Hungarica*, 66: 451-61.
- Taieb, J., and Lachgar-Keltoum, M. 2011. 'L'estradiol : caractéristiques immunoanalytiques', *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 26: 280-86.
- Tjahajati I, 'Sub-Directorate for Animal Disease Observation, Directorate of Animal Health; 2014. The Manual of Animal Diseases, Directorate general of Animals Health and Livestock Services'. Gunanti 2nd ed. Jakarta, India: 145–11
- Tanaka, Y., Sandoval, E. , and Duarte, J. 2019. 'Non-homogeneous distribution of steroids in fecal pellets: An example in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) with progesterone metabolites', *General and Comparative Endocrinology*, 282: 113206.
- Telugu, B. , Walker, A. , and Green, J. 2009. 'Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family--analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes', *BMC Genomics*, 10: 185.
- Terblanche, H., and Labuschagne, J. 1981. 'Plasma progesterone in cattle. II. Levels during the oestrous cycle, pregnancy and parturition', *Journal of the South African Veterinary Association*, 52(3): 187-9.
- Thompson, J. , Forrest, D. , Blanchard, T., Bronson, A. and Lowes, N. 1994. 'Ratios of serum concentrations of testosterone and progesterone from yearling bulls with small testes', *Theriogenology*, 41: 1045-52.
- Touzard, E., Reinaud, P., Dubois, O., Guyader-Joly, C., Humblot, P., Ponsart, C., and Charpigny, G. 2013. 'Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy', *Reproduction*, 146: 347-62.
- Tsang, C. 1974. 'Changes in plasma levels of estrone sulfate and estrone in the pregnant ewe around parturition', *Steroids*, 23: 855-68.

- Vervaecke, H., and Schwarzenberger, F. 2006. 'Endocrine and behavioral observations during transition of non-breeding into breeding season in female American bison (Bison bison)', *Theriogenology*, 66: 1107-14.
- Wallace, R. , Pohler, K. , Smith, M. , and Green, J. 2015. 'Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy', *Reproduction*, 149: 115-26.
- Wang, P. , Chen, Y. , Wei, S. , Wu, K., Lee, T. , Wu, T. and Chiang, Y. 2020. 'Retroconversion of estrogens into androgens by bacteria via a cobalamin-mediated methylation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117: 1395-403.
- Wang, P., Chen, Q., Yuan, P., Lin, S., Chen, H., Li, R., Zhang, X., Zhuo, Y., Li, J., Che, L., Feng, B., Lin, Y., Xu, S., Wu, D., and Fang, Z. 2022. 'Gut microbiota involved in desulfation of sulfated progesterone metabolites: A potential regulation pathway of maternal bile acid homeostasis during pregnancy', *Frontiers in Microbiology*, 13: 1023623.
- Weir, D. 1978. 'Handbook of experimental immunology' ED: Blackwell Scientific ISBN: 9780632000968. Oxford Philadelphia, United States of America.
- White, P. , Wallen, R., Geremia, C., Treanor, J., and Blanton, D. 2011. 'Management of Yellowstone bison and brucellosis transmission risk – Implications for conservation and restoration', *Biological Conservation*, 144: 1322-34.
- White, P., L. Rick, D. Wallen, and E. Hallac. 2015. Yellowstone Bison Conserving an american icon in modern society. The Yellowstone Association, Gardiner, Montana, United States of America: 18-25
- Whitlock, B. , Coffman, E. , Coetzee, J. , and Daniel, J. 2012. 'Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls', *Theriogenology*, 78: 737-46.
- Williams, M. , Olomukoro, A. , Emmons, R. , Godage, N. , and Gionfriddo, E. 2023. 'Matrix effects demystified: Strategies for resolving challenges in analytical separations of complex samples', *Journal of Separation Science*, 46: e2300571.
- Williams, R. 2024. 'Textbook of endocrinology', Ed: Saunders. ISBN: 9780323555968. Philadelphia, United States of America : 1792.
- Wiltbank, M. , Souza, A. , Carvalho, P. , Cunha, A. , Giordano, J. , Fricke, P. , Baez, G. and Diskin, M. 2014. 'Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle', *Animal*, 8(1): 70-11.
- Wooding, F. , Roberts R., and Green J. 2005. 'Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications', *Placenta* 26(10): 807-20.
- Woodling, F. 2022. 'The ruminant placental trophoblast binucleate cell: an evolutionary breakthrough'. *Biology of Reproduction*, 107(3):705-11.

- Wyse, J., Latif, S., Gurusinghe, S., McCormick, J., Weston, L. A., and Stephen, C. P. 2022. 'Phytoestrogens: A Review of Their Impacts on Reproductive Physiology and Other Effects upon Grazing Livestock', *Animals*: 12.
- Xie, S., Low, B. , Nagel, R. , Beckers, J.-F., and Roberts, R. 1994. 'A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm', *Biology of Reproduction*, 51: 1145-53.
- Zhang, W. , Nakao, T., Moriyoshi, M., Nakada, K., Ohtaki, T., Ribadu, A. , and Tanaka, Y. 1999. 'The relationship between plasma oestrone sulphate concentrations in pregnant dairy cattle and calf birth weight, calf viability, placental weight and placental expulsion', *Animal Reproduction Science*, 54: 169-78.
- Zielke, L., Wrage-Mönnig, N., and Müller, J. 2018. 'Development and Assessment of a Body Condition Score Scheme for European Bison (*Bison bonasus*)', *Animals*, 8.
- Zoli, A. , Guilbault, L. , Delahaut, P., Ortiz, W. , and Beckers, J.-F. 1992. 'Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis', *Biology of Reproduction*, 46: 83-9.
- Zongliang, N., Weiwei, Z., Chunwei, Y., Jun, Z., and Yingying, W. 2018. 'Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102: 123-46.