

UNIVERSITE Saad DAHLAB de BLIDA
Faculté des Sciences de la nature et de la vie

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Biotechnologie de la Reproduction Animale

**EVALUATION DE LA FONCTION OVARIENNE DES FEMELLES
D'ELEVAGE PAR RADIOIMMUNODOSAGE (RIA) DE LA
PROGESTERONE A L'AIDE D'UNE TROUSSE LOCALE ET
COMMERCIALE**

Par

Aldjia BENABDELAZIZ (Epse : KHELILI)

Devant le jury composé de :

A.BERBAR	Professeur, Univ Blida1	Président
H. MEFTI KORTEBY	Maître de conférences A Univ Blida1	Examinatrice
D.KHELEF	Professeur,E.N.S.V. Alger	Examineur
M.T.BENYOUCEF	Professeur,E.N.S.A alger	Examineur
R. KAIDI	Professeur, Univ Blida1	Promoteur
A. BENZAID	Chercheur Expert, CRND	Co-promoteur

Blida, 2018

RESUME : Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre du développement d'une trousse radio immunologique (RIA) en phase solide, de dosage direct et fiable de la progestérone dans le lait bovin. Son objectif est la préparation et la caractérisation des trois (03) réactifs de base qui composent la trousse, à savoir i) le traceur (analogue à la progestérone : progestérone 11 α Hemisuccinate, marqué à l'ode125), ii) la phase solide (anticorps spécifique à la progestérone et le traceur) et iii) la gamme étalon progestérone, dans le but d'obtenir un système sensible, reproductible et spécifique pour le dosage de la progestérone. Le traceur est préparé par marquage indirect à la ChloramineT et purifié sur colonne gel Sephadex G-25. L'évaluation du traceur progestérone 11 α HS-monoiodohistamine obtenu a montré une performance très satisfaisante d'un point de vue rendement de marquage de l'histamine (71%), pureté radiochimique (98%), taux de liaisons spécifiques (40%) et non spécifiques (3%) et stabilité dans le temps (3mois). Quant aux résultats d'activité volumique (9 μ Ci/ml) et spécifique (7 μ Ci/ μ g), ils sont tributaires de l'activité de marquage (357 μ Ci). Le système de séparation phase solide préparé avec un anticorps commercial a montré une meilleure séparation des formes libres et liées comparé aux systèmes de séparations par précipitation (charbon/Dextran et PEG/Byglobuline) et une conservation des propriétés immunologiques pendant une durée de 12 mois. Une gamme d'étalons progestérone (0-40 ng/ml) a été préparée dans une matrice tampon phosphate, puis calibrée, lyophilisée et stockée au réfrigérateur. Pour le besoin du dosage, ces étalons sont reconstitués dans la matrice lait déplété. Sur le plan stabilité, ces étalons stockés au réfrigérateur pendant une durée de trois (03) années, enregistrent un taux de dégradation de 10% de la concentration initiale. Une fois la trousse est constituée, l'optimisation des conditions de dosage, a porté sur la durée et la température d'incubation de la réaction d'immunocompétition et le nombre de lavage des tubes de dosage après décantation. Quant à la validation de la trousse, elle a été évaluée d'abord sur un plan analytique, à travers l'estimation du test de précision (variations intra et inter- essais de trois échantillons de lait bovin), les coefficients de variation enregistrés sont respectivement de l'ordre de 13% et 12% pour les basses concentrations et varient entre 5% et 9% pour les concentrations de progestérone moyennes et élevées. Le test d'exactitude révélé par le test de dilution et le test de surcharge enregistrent des pourcentages de recouvrement qui s'échelonnent respectivement entre 86.9% et 126% et entre 83.8% et 118.5%. Sur le plan clinique, la comparaison par analyse de régression des résultats de dosage de la progestérone, d'un lot (30) d'échantillons de lait collecté sur des vaches à différents stades physiologiques, dosés simultanément avec la trousse locale et la trousse commerciale Immunotech montrent une très bonne corrélation ($r= 0.998$) entre les deux trousse.

Mots clés : progestérone, RIA direct, phase solide, validation, lait bovin

ABSTRACT:

The project of the thesis is the development of a direct and fast radioimmunoassay kit (RIA) solid phase of progesterone in bovine milk. Its objective is the preparation and the characterization of three (03) basic components of kit, first, the tracer (progesterone 11 α Hemisuccinate radiolabeled with Iode125), second, the solid phase (specific antibody anti progesterone, also recognizing the tracer) and third, progesterone standards, with an aim of obtaining a significant system, validated and specific for measure of progesterone. The tracer is prepared by indirect radiolabeling, using Chloramine T reagent and purified on Sephadex G-25column. The solid phase system separation, prepared with a commercial antibody showed a better separation of free and bound forms, compared with precipitated systems separations (charcoal/Dextran and PEG/Byglobuline) and a long conservation of immunological properties (12 months). The parameters of optimization of this solid phase are related to antibodies title and dilution buffer, temperature and duration of coating and saturation buffer of coated tubes. A progesterone calibrators was prepared in range of (0-40 ng/ml), in a phosphate buffer matrix and it was calibrated, dispatched, lyophilized and then stored in refrigerator until RIA tests. For tests, the calibrators are reconstituted in free progesterone skim milk matrix. The standards stored in refrigerator were stable during three (03) years, its recorded 10% of degradation of progesterone rate compared with the initial concentration. Once the reagents are prepared and characterized, the optimization of analytical conditions (RIA competitive tests) was related to duration and temperature of incubation of the immuno-competition reaction of and the number of washing of the testing tubes after decantation. The validation of the case was evaluated initially analytical, through the estimate of the test of precision (variations will intra and inter tests of three bovine milk samples). The recorded coefficients of variation are higher than 10% (13% and 12% respectively) for the low concentrations and lower than 10% (vary between 5% and 9%) for the medium and high progesterone concentrations. The test of exactitude was evaled by dilution test and recovery test. The recovery was found about respectively 86.9%-126% and 83.8%-118.5%. Clinical validation results of progesterone levels of batch (30) of milk samples, collected on cows at various physiological stages, estimated by both progesterone RIA kits from Immunotech and in house, was evaluated by regression analysis, shows very good correlation ($r= 0.998$).

Key words: progesterone, direct RIA, solid phase, validation, bovine milk

ملخص

مشروع الأطروحة يدخل في إطار البحث و التنموية وذلك بتطوير إستعمال تقنية نووية ولا وهي عدة المقياس المناعية الشعاعية **trousse RIA** المرحلة الصلبة لقياس البروجسترون في حليب البقر. الهدف هو إعداد و توصيف 3 مكونات اساسية التي تدخل في تكوين عدة لمقياس المناعية الشعاعية. وسم البروجسترون 11 هيميسيكسينات مسممة با 125 I - المرحلة الصلبة : تطعيم الجسم المضاد للبروجسترون في انبوب بلاستيكي - عدة المقياس المناعية الشعاعية لهرمون البروجسترون بهدف الحصول على نظام حساس و محدد لقياس كمية البروجسترون .- وسم البروجسترون با 1125 محضر بطريقة تشييع غير مباشرة بالكورامين T وتم تصفيته عبر عمود جل سيفادكس G-25. تقييم وسم البروجسترون با 1125

هيميسيكسينات المتحصل عليه اعطى نتائج جد مرضية من حيث مردودية التسميم 71% ، النقاوة الراديوكيميائية 98% و معدل التثبيت المعين 40% . و الغير المحدد 3% و إستقرار في الحفظ لمدة 3 اشهر .

اما بالنسبة لنتائج النشاط الحجمي 9 $\mu\text{ci/ml}$ و النشاط المحدد 7 $\mu\text{ci/g}$ و هما يعتمدان على كمية التسميم وهي 357 μci . نظام فصل المرحلة الصلبة المحضرة بلاجسام المضادة التجارية اظهر افضل طريقة فصل بين الأشكال الطليقة و المقيدة وهذا مقارنة مع نظم الفصل عن طريق ترسيب (فحم ديكستران / PEG) و الحفاظ على الخواص المناعية لمدة 12 شهر. المعايير المثلى للمرحلة الصلبة تكمن في معيار الجسم المضاد و امحلول المنظم، درجة الحرارة و المدة الزمنية لتثبيت الجسم المضاد و المحلول المشع للأنابيب المثبتة . إعداد مجموعة من معايير للبروجسترون (0-40 ng/ml) في مصفوفة محلول منظم الفوسفات، معايرة و مقسم مجفف بالتجميد و مخزن في الثلجة في إنتظار المقياس المناعية للبروجسترون ،ثم تتم استعادة مصفوفة الحليب المنضب .على مستوى الإستقرار، هذه المعايير المخزنة في الثلجة لمدة 03 سنوات سجلت تدهور معدله 10% من التركيز البدائي. بعد إكمال العدة، تحسين شروط المقياس (المدة) ، درجة حضانة معادلة رد الفعل المناعي و عدد غسل بعد تسوية انابيب إختبار.

للتحقق من العدة المناعية الشعاعية ، تم تقييمها على المستوى التحليلي من خلال دقة التقدير لثلاث عينات من حليب البقر، معامل التباين المسجل على التوالي 13% و 12% للتركيزات المنخفضة و يتراوح بين 5% و 9% لتركيزات هرمون البروجسترون المتوسطة و العالية. إختبار الدقة التي كشفت عنها إختبار التخفيف و الزيادة سجلت نسب مئوية تتراوح بين 86.9% و 126% و بين 83.3% و 118.5% .

في المجال الطبي المقارنة عن طريق تحليل الإنحدار لنتائج مقياس البروجسترون مجموعة مكونة من 30 عينة من حليب البقر في مختلف الأطوار الفيزيولوجية قيست بلعدة المطورة محلها و العدة المستوردة، تظهر علاقة جيدة $r=0.998$ بين قيم البروجسترون المتحصل عليها بكلتا العديتين.

كلمة المفاتيح : البروجسترون ، RIA ، المرحلة الصلبة , حليب البقر , التحقق من صحة

REMERCIEMENTS

Pour commencer je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury :

Pr Berbar Ali, Professeur à la Faculté des Sciences Vétérinaires de l'Université de Blida 1 de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Hommages respectueux.

Dr Mefti Korteby Hakima, Maître de Conférences A à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie de Blida 1 pour avoir accepté d'examiner ce travail. Sincères remerciements.

Pr Khelef Djamel, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être membre de jury. Je le remercie également pour sa disponibilité. Hommages respectueux.

Pr Benyoucef Mouhamed Tahar, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique D'Alger pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je le remercie également de m'avoir toujours conseillé, soutenu et encouragé comme un père tout au long de mon cursus universitaire, de la graduation et ma vie professionnelle. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et ma gratitude éternelle.

Pr Kaidi rachid, Professeur à la Faculté des Sciences Vétérinaires de l'Université de Blida 1 pour avoir accepté de diriger ce travail et assurer mon encadrement. Permettez-moi de vous exprimer toute mon estime et mon admiration pour votre bonté, votre modestie, votre compréhension, ainsi que vos qualités professionnelles qui ne peuvent que susciter ma grande estime et profond respect.

Dr Benzaid Ahmed, Chercheur et Expert au Centre de Recherche Nucléaire de Draria, mon co-promoteur, pour avoir accepté de codiriger ce travail, pour le soutien, les conseils avisés et l'attention apportée tout au long de sa réalisation. Je vous remercie infiniment.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à mon amie et collègue Mme **Boudjemai Samia**, Chercheur au Centre de Recherche Nucléaire de Draria. Je te renouvelle ma profonde et éternelle reconnaissance de m'avoir fait bénéficier de tes connaissances et tes conseils et de ta grande curiosité scientifique. Enfin, merci pour tout ce que vous m'avez transmis. Merci de m'avoir toujours boosté. Merci pour ta confiance et ton encadrement quotidien au laboratoire, qui m'ont permis de mener à bien et à terme ce travail.

A **Rachid** mon partenaire dans le travail et dans la vie. Tu as toujours été présent pour me soutenir, m'apporter ton aide à chacune des phases de ce travail et m'encourager, Tu as beaucoup participé à ce travail avec le mérite de me supporter dans mes moments de doutes et de stress. Merci tout simplement.

A mes responsables au niveau du Centre de Recherche Nucléaire de Draria, Monsieur le Directeur Général du centre **Mr Magnouche Abdelhalim**, le Secrétaire du Directeur **Mr Chegrouche Salah**, le responsable de la Division de Physique et Applications Nucléaires **Mr Allek Mouloud**. Vous m'avez accompagné et fourni toutes les conditions matérielles et humaines, nécessaires au bon déroulement et l'accomplissement de ce travail. Merci pour votre écoute, votre disponibilité et aide.

J'exprime toute ma reconnaissance à mes collègues des autres services du C.R.N.D et du C.R.N.A pour leur aide et support tout au long de la réalisation de ce travail. Mes hommages très respectueux.

Mes sincères remerciements à **Mr Besbaci et Mr Belabes**, enseignants à la Faculté des Sciences Vétérinaires de l'Université de Blida 1, pour leur aide, en me fournissant les prélèvements de lait nécessaires à la validation de ce travail, leur soutien et les encouragements. Merci infiniment, je vous souhaite beaucoup de réussite.

Je remercie également le personnel de l'Institut Pasteur d'Alger pour avoir mis à notre disposition l'animalerie et nous avoir permis de mener notre travail de production des anticorps. Soyez assurés de ma reconnaissance.

Je n'oublierai pas d'adresser également mes sincères remerciements à **Mr Abdelli Ahmed Amine** pour avoir contribué dans le travail de production des anticorps. Je vous souhaite le meilleur à venir.

J'adresse mes plus sincères remerciements à ma chère famille, mes sœurs, mes frères et en particulier mes très chers et adorables parents, qui ont toujours été à mes côtés tout le long de la réalisation de cette thèse et qui m'ont toujours accompagné, aidé, soutenu et encouragé.

Enfin, je voudrai remercier toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	17
INTRODUCTION	20

CHAPITRE. 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. 1.	PROGESTERONE STEROÏDE DE LA REPRODUCTION	24
1.1.1.	Structure de la molécule	24
1.1.2.	Propriétés physiques	24
1.1.3.	Biosynthèse de la progestérone	24
1.1.4.	Actions physiologiques de la progestérone	27
1.1.5	Régulation et modifications hormonale au cours du cycle œstral	28
1.1.6	Evolution de la progestérone dans les matrices sang et lait	31
1 .2.	L'INTERET DU DOSAGE DE LA PROGESTERONE CHEZ LES FEMELLES D'ELEVAGE	34
1.3.	LES TECHNIQUES DE DOSAGE DE LA PROGESTERONE	36
1.3.1.	Historique du dosage	36
1.3.2.	Les dosages immunologiques	37
1.3.2.1	Bases physico-chimiques du système antigène-anticorps	37
a)	Les liaisons antigène-anticorps	37
b)	Propriétés de la liaison Antigène/Anticorps	39
1.4.	LE RADIOIMMUNODOSAGE (RIA)	42
1.4.1.	Principe de la méthode	42

1.4.2.	Constituants d'une trousse RIA	43
1.4.2.1.	Le traceur radiomarqué	43
a)	Choix du radiomarqueur	43
b)	Procédures de marquage à l'iode (NaI ¹²⁵)	44
c)	Radiomarquage des protéines et des haptènes	48
d)	Purification du traceur radiomarqué	53
e)	Paramètres de caractérisation du traceur radiomarqué	53
f)	Stabilité et conservation du traceur	54
1.4.2.2.	Techniques de séparation des formes libres et liées	54
1.4.2.3.	Préparation et calibration d'une gamme d'étalons	57
1.4.3	Validation d'une trousse radioimmunologique	57
1.4.3.1	Evaluation analytique de la trousse	58
a)	La limite de détection	58
b)	Le test de précision	58
c)	Le test d'exactitude	58
1.4.3.2	Evaluation clinique de la trousse	59

CHAPITRE. 2 : TECHNIQUES D'ETUDE ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

2.1	PREPARATION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DU TRACEUR 11 α HYDROXY- PROGESTERONE-HEMISUCCINATE- IODOHISTAMINE	61
2.1.1.	Réactifs	61
2.1.2.	Procédé de marquage indirect à l'iode-125 de la 11 α hydroxy-progestérone- hemisuccinate	62
2.1.2.1.	Marquage de l'histamine par le NaI ¹²⁵	62
2.1.2.2.	Activation du conjugué 11 α hydroxy-progestérone- hemisuccinate	63
2.1.2.3.	Conjugaison du conjugué activé à l'histamine iodomarquée	64
2.1.3.	Extraction chimique du traceur 11 α hydroxy-progestérone- hemisuccinate-iodohistamine	64
2.1.4.	Purification du traceur 11 α hydroxy-progestérone- hemisuccinate-iodohistamine	65
2.1.5.	Caractérisation du traceur hydroxy-progestérone-hemisuccinate-iodohistamine	66
2.1.5.1.	Le rendement de marquage	66
2.1.5.2.	L'activité spécifique	66

2.1.5.3.	L'activité volumique	66
2.1.5.4.	La pureté radiochimique	66
2.1.5.5	L'immunoréactivité	67
2.1.5.6.	Stabilité du traceur dans le temps	67
2.2.	PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI 11 α HYDROXY-PROGESTERONE-HEMISUCCINATE-BSA	68
2.2.1.	Réactifs	68
2.2.2.	Dispositif expérimental et protocole d'immunisation des lapins	68
2.2.2.1	Animaux et lieu expérimental	68
2.2.2.2	Protocole d'immunisation des lapins	68
2.2.2.3	Fréquences des prélèvements	69
2.2.2.4	Récupération de l'antisérum	70
2.2.3.	Purification de l'antisérum	70
2.2.4.	Caractérisation des anticorps	71
2.2.4.1	Détermination du titre des antisérums	71
2.2.4.2	Détermination de la spécificité de l'antisérum	73
2.3.	PREPARATION ET STABILITE DE LA PHASE SOLIDE	74
2.3.1.	Réactifs	74
2.3.2.	Procédé de fixation des anticorps sur des tubes	74
2.3.3.	Procédé de préparation des tubes destinés à l'évaluation de la liaison non spécifique	74
2.3.4	Comparaison du système phase solide avec les systèmes PEG/ γ bovine globuline et Charbon actif-Dextran	75
a)	Protocole de détermination de l'immunoréactivité par le système de séparation phase solide	75
b)	Protocole de détermination de l'immunoréactivité par le système de séparation phase liquide (PEG/ bovine γ globuline)	75
c)	Protocole de détermination de l'immunoréactivité par le système de séparation phase liquide (Charbon/Dextran)	75
2.3.5	Etude de la stabilité de la phase solide	76
2.4.	PREPARATION ET CALIBRATION DE LA GAMME D'ETALONS PROGESTERONE LAIT	76

2.4.1.	Réactifs	76
2.4.2.	Procédé de préparation des étalons	77
2.4.2.1	Préparation de la matrice zéro progestérone	77
2.4.2.2	Préparation et calibration de solution mère de progestérone	77
2.4.2.3	Préparation des solutions standards de progestérone	78
2.4.3.	Calibration des étalons contre un étalon secondaire	78
2.4.4.	Stabilité des étalons dans le temps	79
2.5.	MISE AU POINT DE DOSAGES RADIOIMMONOLOGIQUES DANS UNE MATRICE LAIT ECREME	79
2.5.1.	Optimisation du dosage RIA	79
2.5.2.	Protocole de dosage radioimmunologique adopté pour la trousse développée	80
2.6	VALIDATION DE LA TROUSSE RIA PROGESTERONE DEVELOPPEE	81
2.6.1	Réactifs	81
2.6.2	Traitement des échantillons de lait	81
2.6.3	Evaluation analytique de La trousse RIA progestérone développée	81
2.6.3.1	Le test de précision	81
2.6.3.2	Le test d'exactitude	81
2.6.4	Evaluation clinique de la trousse RIA progestérone développée	82
2.7	ANALYSES STATISTIQUES	82

CHAPITRE. 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1	PREPARATION DU TRACEUR "PROGESTERONE 11- α - HEMISUCCINATE- IODO- HISTAMINE	84
3.1.1	Rendement de marquage du complexe iodo-histamine	84
3.1.1.1	Etude de l'effet de la durée de stockage du complexe iodo- histamine sur le rendement de marquage de l'histamine	86
3.1.2	Extraction du traceur progestérone 11- α -hemisuccinate- iodo- histamine	86

3.1.3.	Purification de la progestérone 11- α -hemisuccinate-iodo-histamine	88
3.1.4	Caractérisation du traceur la progestérone 11- α -hemisuccinate-iodo- histamine	89
3.1.4.1	Contrôle de la PRC et de l'immunoréactivité	89
3.1.4.2	Activité spécifique et activité volumique	91
3.1.5	Contrôle de la stabilité	92
3.1.5.1	Contrôle de la pureté radiochimique_	92
3.1.5.2	Contrôle de l'immunoréactivité_	93
3.2	CARACTERISATION DES ANTICORPS POLYCLONAUX	95
3.2.1	Evaluation du titre	95
3.2.2	Evaluation de la spécificité	100
3.3	PREPARATION ET ETUDE DE LA STABILITE DE LA PHASE SOLIDE	103
3.3.1	Performances de la phase solide	103
3.3.2	Optimisation des conditions de préparation de la phase solide	105
3.4	PREPARATION, CALIBRATION ET STABILITE DES ETALONS	106
3.4.1	Calibration de la solution mère de progestérone	106
3.4.2	Préparation et calibration des standards dans différentes matrices	107
3.4.3	Etude de la stabilité des étalons	111
3.5	OPTIMISATION DU DOSAGE RIA PROGESTERONE ET EVALUATION DE LA COURBE D'ETALONNAGE	112
3.5.1	Paramètres d'optimisation de la courbe d'étalonnage	112
3.5.2	Evaluation de la courbe d'étalonnage	114
3.6	VALIDATION DE LA TROUSSE RIA PROGESTERONE/LAIT DEVELOPPEE	115
3.6.1	Evaluation analytique de la trousse RIA Progestérone/lait développée	115

3.6.1.1	Le test de précision	115
3.6.1.2	Le test d'exactitude	116
a)	Le test de dilution	116
b)	Le test de surcharge	118
3.6.2	Evaluation clinique de la trousse RIA Progestérone/lait développée	120
3.7	ESTIMATION APPROXIMATIVE DU COUT DE PRODUCTION DE LA TROUSSE DE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE (RIA) DE LA PROGESTERONE.	123
	CONCLUSION GENERALE	126
	ANNEXES	131
	ABREVIATIONS	136
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140

LISTES DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Partie Bibliographique		
Figure 1.1 :	Structure moléculaire de la progestérone	24
Figure 1.2 :	Synthèse de la prégnénolone à partir du cholestérol	25
Figure 1.3 :	Voie $\Delta 4$	25
Figure 1.4 :	Schéma général de la biosynthèse des hormones stéroïdes	26
Figure 1.5 :	Action de la progestérone sur l'ovulation	27
Figure 1.6 :	Régulation hormonale du cycle œstral	29
Figure 1.7 :	Schéma des modifications folliculaire et des concentrations hormonales plasmatique chez la vache	31
Figure 1.8 :	Exemples typiques de profils progestéronimiques chez la vache	35
Figure 1.9a :	Schéma de l'interaction entre un antigène et différents anticorps	37
Figure 1.9b :	Schéma des liaisons entre un antigène et un anticorps	38
Figure 1.10 :	Schéma démonstratif de l'affinité antigène-anticorps	39
Figure 1.11 :	Schéma démonstratif de l'avidité d'un anticorps-antigène	41
Figure 1.12 :	Schéma démonstratif des liaisons croisées de l'anticorps	41
Figure 1.13 :	représentation schématique du principe du radioimmunos dosage de compétition	42
Figure 1.14 :	Structure de l'iodothyronine	44
Figure 1.15 :	Résidus susceptibles d'être iodés par substitution	45
Figure 1.16 :	Les agents d'oxydation	46
Figure 17 :	Principe de marquage à l'iode 125 par la méthode à la chloramineT.	47
Figure 1.18 :	Principe de marquage à l'iode 125 par oxydation à la peroxydase	47
Figure 1.19 :	La radioiodination direct par substitution électrophile	48
Figure 1.20 :	Résidus pouvant d'être iodés	49
Figure 1.21 :	principe de marquage d'une protéine ou haptène par le TME	50
Figure 1.22 :	Réactif de <i>Bolton et Hunter, 1973</i>	51
Figure 1.23 :	Principe de marquage d'une protéine par le réactif de Bolton et Hunter	51
Figure 1.24 :	conjugaison de l'iodohistamine (^{125}I -histamine- NH_2) aux	52

dérivées d'anhydride mixte de la molécule à marquer et formation d'un traceur et de sous-produits de marquage

Figure 1.25 : Méthodes de séparation chimiques	55
Figure 1.26 : Méthodes de séparation par immunoprécipitation	55
Figure 1.27 : Méthodes de séparation par fixation d'Ac sur un support solide	56

Partie Expérimentale

Figure 2.1 : Schéma de la réaction de marquage	62
Figure 2.2 : Réactifs de l'activation de la progestérone 11 α -HS	63
Figure 2.3 : Réaction d'activation et formation d'anhydrides mixtes	63
Figure 2.4 : Réaction de conjugaison du complexe iodohistamine aux dérivées d'anhydrides mixtes	64
Figure 2.5 : Traceur 11 α hydroxy-progestérone-hemisuccinate-Iodohistamine	65
Figure 2.6 : injection intradermique de l'immunogène	69
Figure 2.7 : prélèvement de sang au niveau de la veine marginale de l'oreille	69
Figure 2.8 : Technique de purification des immunoglobulines : précipitation par les sels	71

Partie Résultats et Discussion

Figure 3.1 : Radiochromatogramme de l'histamine marquée à l'iode 125 (Hist-I ¹²⁵) obtenu par électrophorèse sur papier	85
Figure 3.2 : Stabilité du rendement de marquage de l'histamine en fonction de la durée de stockage à -10°C	86
Figure 3.3 : Profils de pureté radiochimiques des fractions 1 et 3	87
Figure 3.4 : Profil d'élution de la fraction 2 obtenu après purification par gel filtration sur gel Sephadex G-25	88
Figure 3.5 : profils de pureté radiochimiques de la fractions 2 (pics a,b et c)	90
Figure 3.6 : Evolution dans le temps de la pureté radiochimique du traceur F2b stocké à 10°C et - 6°C	93
Figure 3.7 : Evolution dans le temps des taux de liaisons spécifiques et non spécifiques du traceur F2b stocké à 10°C et - 6°C	94
Figure 3.8a : Titre de l'antisérum du lapin A en fonction des rappels	97
Figure 3.8b : Titre de l'antisérum du lapin B en fonction des rappels	98
Figure 3.9 : Evolution des titres des antisérums des lapins A et B au cours de 8 mois d'immunisation	100
Figure 3.10 : Détermination de la spécificité des antisérums lors d'un dosage RIA de la 11 α hydroxyprogestérone-HS, la progestérone, la 5 α pregnane 3,20 dione et la 11-déoxycorticostérone	101

Figure 3.11 : Evolution de l'immunoréactivité en fonction des titres des anticorps pour les systèmes de séparation solide et liquide	104
Figure 3.12 : Stabilité de la phase solide en fonction du temps de stockage	105
Figure 3.13 : Taux progestéronémique des étalons reconstitués dans trois (03) matrices, dosés par RIA/Immunotech	108
Figures 3.14a-b et c : Courbes de régression linéaires des concentrations de progestérone dosées dans les différentes matrices	109
Figure 3.15 : Courbe d'étalonnage de dosage de la progestérone.	110
Figure 3.16 : courbe de régression linéaire correspondant à la stabilité des étalons.	112
Figure 3.17 : Courbe d'étalonnage progestérone dans une matrice Lait à 50%.	114
Figure 3.18 : Epreuves de dilution de la trousse RIA/Prog locale	118
Figure 3.19 : Epreuves de surcharge de la trousse RIA/Progestérone locale	120
Figure 3.20 : Courbe d'étalonnage progestérone dans une matrice Lait (trousse Immunotech et locale)	121
Figure 3.21 : courbe de régression linéaire des taux de progestérone dosés dans les échantillons de lait de vaches au moyen d'une trousse locale et commerciale	122
Figure 3.22 : représentation des taux de couverture des concentrations de progestérone dosées par la trousse locale/ Immunotech	123

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Partie Bibliographique		
Tableau 1.1 :	Paramètres des cycles œstraux chez quelques ruminants	31
Tableau 1.2 :	Niveau de progestérone (ng/ml) dans le sang ou le lait écrémé en fonction de l'état physiologique de la femelle	32
Partie Expérimentale		
Tableau 2.1a :	Protocole d'évaluation du titre des antisérums par le système de séparation PEG/ bovine γ globuline	72
Tableau 2.1b :	Protocole de détermination de l'immunoréactivité avec le système de séparation phase solide.	75
Tableau 2.1c :	Protocole de détermination de l'immunoréactivité avec le système de séparation Charbon actif/Dextran.	76
Tableau 2.2 :	Dilutions des étalons progestérone dans du Tampon Phosphate	79
Tableau 2.3 :	Mode opératoire du dosage RIA progestérone de la trousse Immunotech sérique	79
Tableau 2.4 :	Protocole de dosage radioimmunologique adoptée pour la trousse développée.	80
Partie Résultats et Discussion		
Tableau 3.1 :	Evaluation des produits d'extraction de la progestérone radiomarquée	87
Tableau 3.2 :	Activité enregistrée par les trois pics d'élution de la fraction 2	89
Tableau 3.3 :	Caractérisation des pics collectés de la fraction 2	90
Tableau 3.4 :	Caractérisation des traceurs par mesure de l'activité spécifique et volumique	91
Tableau 3.5a :	Pourcentage de liaisons maximums (Bo/Tc) des antisérums obtenus par le lapin A au cours de huit (08) mois d'immunisation	96
Tableau 3.5b :	Pourcentage de liaisons maximums (Bo/Tc) des antisérums obtenus par le lapin B au cours de huit (08) mois d'immunisation	96
Tableau 3.6 :	Pourcentage de réactions (B/Bo) induit par les différents stéroïdes avec les antisérums produits lors de la variation de la concentration (ng/ml) de chacun des étalons	101
Tableau 3.7 :	Spécification des antisérums produits exprimée en pourcentage de réactions croisées (%Rc) obtenus par les différents stéroïdes testés	102

Tableau 3.8 : Taux d'immunoréactivité en fonction du titre de l'anticorps dans le cas de séparation par Phase solide et phase liquide (Charbon/Dextran et PEG/ BγG)	103
Tableau 3.9 : Effet de la nature du tampon de saturation des tubes après Coating sur les taux de liaisons spécifiques	106
Tableau 3.10 : Concentrations en progestérone (ng/ml) dosées dans les standards reconstitués dans trois matrices	107
Tableau 3.11 : Stabilité des concentrations de progestérone des étalons lyophilisés	111
Tableau 3.12 : Effet de la durée et de la température d'incubation sur la réaction d'immunocompétition	113
Tableau 3.13 : Effet du nombre de lavage des tubes après décantation sur la réaction d'immunocompétition	113
Tableau 3.14 : Valeurs moyennes des paramètres de contrôle de qualité des courbes standard obtenues durant 8 semaines d'essais	115
Tableau 3.15 : Reproductibilité intra-essais de la trousse RIA locale de dosage de la progestérone	116
Tableau 3.16 : Reproductibilité inter-essais de la trousse RIA locale de dosage de la progestérone	116
Tableau 3.17 : Epreuve de dilution de la trousse RIA locale de dosage de la Progestérone.	117
Tableau 3.18 : Epreuve de surcharge de la trousse RIA locale de dosage de la progestérone	119
Tableau 3.19 : Estimation approximative du coût en DA du développement d'une trousse RIA progestérone pour les besoins de l'élevage algérien	124

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

La production laitière constitue une branche stratégique du secteur agricole algérien eu égard à la place prépondérante que le lait occupe dans le modèle de consommation des algériens et notamment des couches sociales à faibles revenus. Elle est fournie à plus de 72% par l'élevage bovin [1] et ne couvre qu'environ 40% des besoins de consommation locale [2] sur la base d'un ratio annuel estimé à 110 litres/habitant [3] classant l'Algérie à la première place parmi les pays du Maghreb [4].

Dans le but de répondre à une forte demande en lait et produits laitiers induite par un développement démographique et un exode rural de la population algérienne, les pouvoirs publics ont mis en œuvre une politique d'approvisionnement du marché local basée dans un premier temps sur des importations massives de poudres de lait et produits laitiers. A titre indicatif, ces importations laitières sont estimées à 1.17 milliard USD en 2015 [5]. Par ailleurs, la flambée des prix des denrées alimentaires sur le marché international et la chute des revenus pétroliers ont contraint l'Algérie à réduire la facture de ses importations qui, tout de même, a atteint les 980 millions USD en 2016 [5] et à réorienter sa politique vers une diversification économique.

Dans cette optique et suite à la crise laitière de 2007 sur le marché mondial, [6]. Les pouvoirs publics ont donné alors plus d'importance au développement de la production nationale en accordant des fonds de régulation à des filières agricoles considérées comme stratégiques. Dans ce cadre, la filière lait a bénéficié de mesures incitatives en faveur des éleveurs laitiers et des autres opérateurs de ce secteur, en termes d'aides et de subventions pour le renforcement des segments de cette filière.

Ainsi, la gestion de la reproduction des vaches laitières par des techniques modernes (synchronisation et insémination artificielle) constitue un préalable important pour la production laitière. Néanmoins les problèmes constatés dans les troupeaux laitiers tels que l'infécondité et l'infertilité ont des conséquences économiques négatives, engendrés entre autres, par le manque de suivi régulier de l'itinéraire zootechnique et sanitaire entraînant souvent des surcoûts pour l'éleveur résultant de traitements vétérinaires, de distribution de rations alimentaires inadéquates, des réformes et de faibles rendements laitiers [7]. Par ailleurs, le constat d'une faible maîtrise de la conduite de la reproduction bovine rapporté par d'autres auteurs dans plusieurs élevages laitiers locaux indique que les paramètres de fécondité et de fertilité mesurés sont souvent en deçà des normes établies pour une gestion efficiente de la reproduction des troupeaux bovins [8, 9, 10, 11].

La thèse est focalisée sur les possibilités d'introduire des innovations techniques en matière d'analyses de laboratoire des profils hormonaux des animaux d'élevage pour fournir le conseil à tout éleveur laitier qui se fixe comme objectif, l'obtention d'un veau par vache et par an et par conséquent une production au cours d'une lactation régulière. Le défi de ce type d'éleveur laitier consiste à améliorer la conduite de la reproduction de son troupeau par une bonne connaissance des états physiologiques des différentes femelles dans son élevage.

L'objectif de la thèse consiste à apporter une contribution en matière de valorisation des informations collectées lors de l'observation du troupeau par l'éleveur, par l'analyse des niveaux périphériques de la progestérone dans le lait ou le sang par radioimmunoanalyse (RIA). Le profil progestéronémique constitue un des outils permettant de mieux identifier et caractériser les cycles de reproduction des femelles du troupeau bovin. En effet, le dosage de ce biomarqueur, à des intervalles réguliers, permet de déterminer la présence d'un corps lutéal fonctionnel ou l'ovulation, de réaliser un diagnostic précoce de non gestation, des cas d'infertilité et bien d'autres avantages pour l'éleveur et le technicien (vétérinaire et inséminateur). De telles analyses permettent de mieux gérer, en général, la fonction de reproduction des élevages et d'améliorer par conséquent leur rentabilité économique.

Parmi les outils actuels de diagnostic hormonal, les techniques immunologiques, regroupant l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives, mettant en jeu la réaction antigène-anticorps, constituent un moyen performant et précis pour quantifier et exploiter les profils hormonaux. La mise au point du radioimmunodosage est attribuée à **Yalow et Berson** qui réalisèrent en 1959 le premier dosage immunologique de l'insuline humaine dans le plasma [12].

En Algérie, l'utilisation de la technique de radioimmunodosage des hormones stéroïdiennes dans le sang et/ou le lait chez les animaux d'élevage a été introduite en 1990, dans le cadre de projets de coopération AIEA/FAO/Algérie. Un laboratoire de zootechnie a été créé en ce sens au CDTN (Alger) en collaboration avec des instituts algériens (INMV, ITELV et CNIAAG).

Actuellement, les trousse RIA progestérone (40 dosages en double) à usage humains sont les seules qui sont importées à un prix de revient de 105 USD/trousse. Ce type de produit nécessite lors de son acheminement des conditions de conservation à une température de 4-8°C et des durées d'acheminement très courtes en raison de l'iode-125 (I^{125}) incorporé dans l'un des réactifs (traceur).

Eu égard à l'impact économique positif d'une bonne gestion de la reproduction sur la rentabilité des élevages, la thèse s'attelle à apporter une contribution dans le développement local des différents composants de la trousse de dosage de la progestérone chez les animaux d'élevage dans le but de participer à l'extension de ce type d'innovation technique à une échelle plus large en Algérie pour l'accroissement des productions animales.

Ainsi, ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche et développement technologique initié depuis quelques années au sein du Département des Applications Nucléaires, relevant du Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND) traitant d'un thème relatif au développement de trousse Radio-Immunologiques et Radio-Immunométriques pour le dosage in vitro. La thèse est réalisée dans ce contexte et elle est consacrée au développement et la validation d'une trousse de dosage radioimmunologique de la progestérone dans le lait de bovins laitiers.

La thèse est structurée en trois parties :

1. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique (chapitre 1). Elle comporte des rappels succincts sur l'hormone de la reproduction " la progestérone", l'intérêt de son dosage pour le suivi de la fonction de la reproduction chez la vache laitière, les bases physiologiques et hormonales du cycle sexuel de la vache, les techniques immunologiques de dosage de la progestérone, présentation du radioimmunos dosage, les procédés utilisées pour la préparation, la purification et la caractérisation de chaque composant de la trousse (traceur, phase solide, standards) de radioimmunos dosage.
2. La deuxième partie est consacrée à l'expérimentation réalisée (chapitre 2). Elle décrit l'ensemble du matériel utilisé et les méthodes choisies ainsi que les conditions expérimentales adoptées pour la réalisation des différentes expérimentations.
3. La troisième partie (chapitre 3) traite des différents résultats obtenus au cours des étapes de préparation, purification et caractérisation des composants de la trousse. Ils sont suivis de la validation analytique et clinique de la trousse préparée localement en comparaison avec une trousse commerciale.
4. Enfin la thèse se termine par une conclusion générale qui synthétise les principaux points scientifiques et techniques qui résultent de l'expérimentation effectuée ainsi que les perspectives qui se dégagent de la mise au point de trousse pour le radioimmunos dosage de la progestérone dans le lait de vaches.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. PROGESTERONE STEROÏDE DE LA REPRODUCTION :

1.1.1. Structure de la molécule :

La progestérone (P_4), encore appelée 4 pregnène 3,20-dione, est une hormone stéroïdienne à 21 atomes de carbone, de formule $C_{21}H_{30}O_2$ (**Figure 1.1**). Elle possède deux fonctions cétone ($O=$) au niveau du carbone (C3) et (C20), deux fonctions méthyle ($-CH_3$) au niveau du carbone (C10) et (C13), une double liaison en $C4=C5$ et un groupement $COCH_3$ en C17. La progestérone est une substance cristalline, incolore, sa masse moléculaire est de 314,46g/mol et sa demi-vie est de dix à 15 minutes [13].

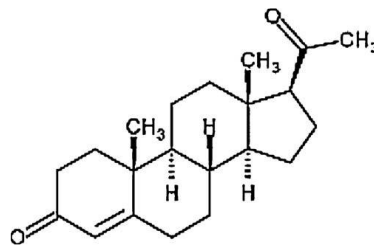


Figure 1.1 : Structure moléculaire de la progestérone

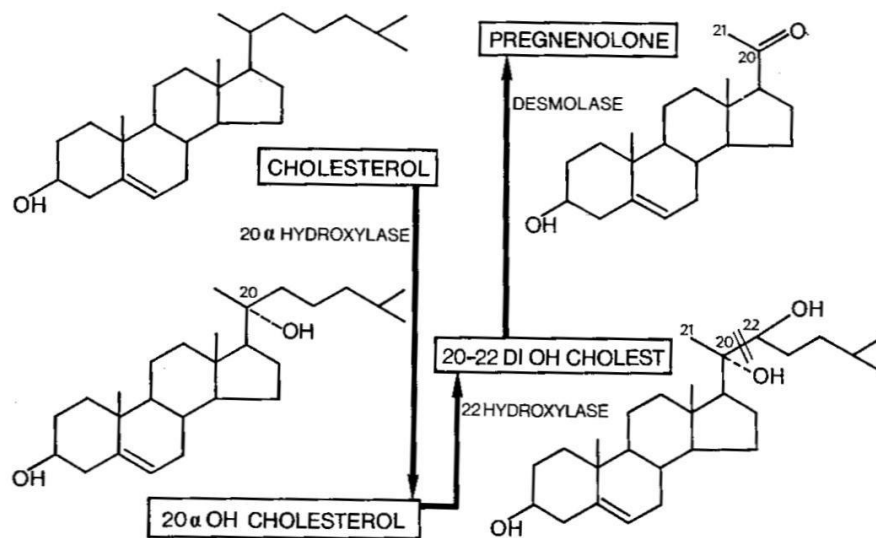
La progestérone fut découverte en premier en 1929 par Corner et Allen "la tureprogestine" [14]. Butenandt réussit, en 1934, à isoler l'hormone du corps jaune en traitant six cents kilos d'ovaires de truies, soit 50 000 animaux, il a extrait 12 milligrammes de «progestine» cristallisée [15].

1.1.2. Propriétés physiques :

La progestérone est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans certains solvants organiques, tels les éthers, dioxane ou les essences [16]. Elle possède une bande d'absorption dans l'ultraviolet, avec un pic d'absorption situé à 240 nm et une fluorescence en milieu alcalin [17].

1.1.3. Biosynthèse de la progestérone :

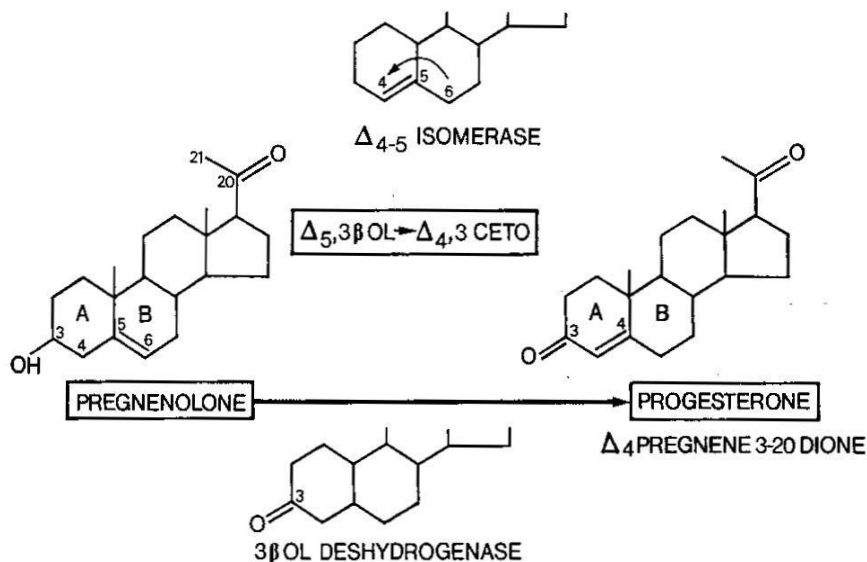
La progestérone est synthétisée à partir du cholestérol (C27) fourni par les lipoprotéines (LDL). Au cours d'une première phase mitochondriale, le cholestérol subit l'action de trois enzymes (la 20-alpha-hydroxylase, la 22-hydrolase puis la 20-22-desmolase). Sa chaîne latérale est rompue et il se forme de la 5-prégnène-3 β -ol, 20-one ou prégnénolone (**Figure 1.2**).



- Action de la 20 α -hydroxylase : mise en place d'un -OH en alpha sur le C20 ;
- Action de la 22 α -hydroxylase : mise en place d'un -OH sur C22 ;
- Action de la desmolase : après action des deux premières, elle coupe la liaison entre les deux carbones 20 et 22.

Figure 1.2 : Synthèse de la prégnénolone à partir du cholestérol [18]

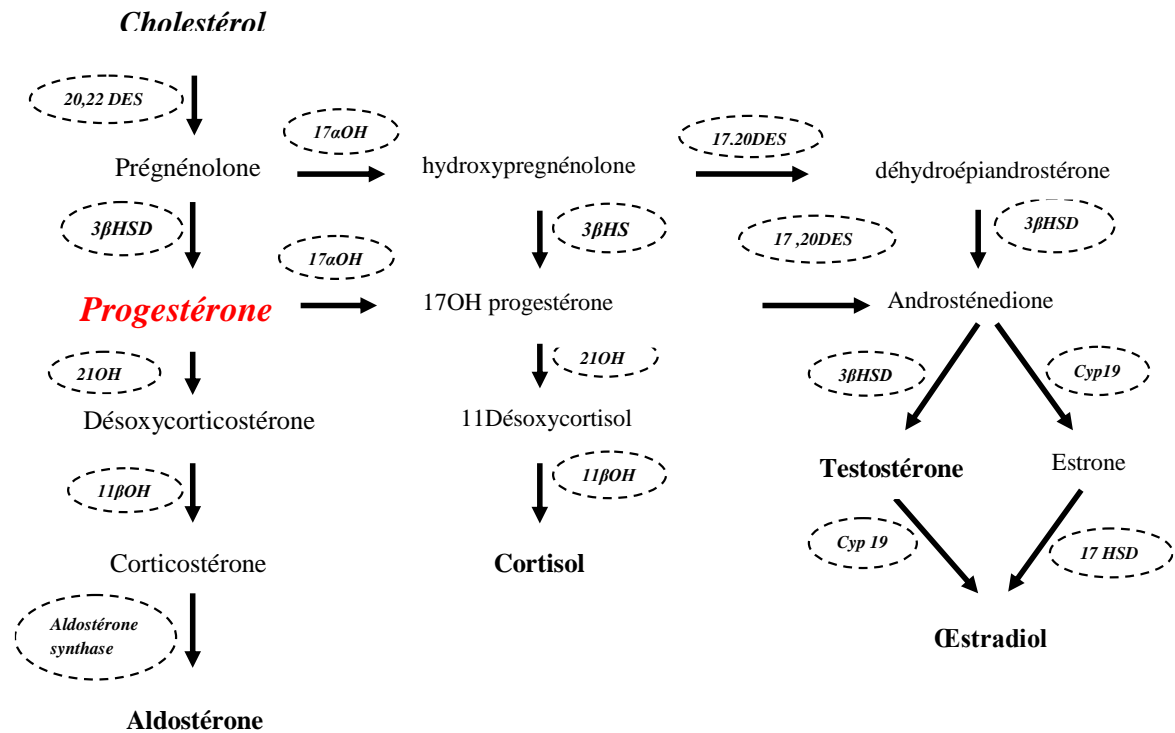
La transformation de la prégnénolone en progestérone se fait par la voie Δ_4 , qui est en deux étapes (**Figure 1.3**) :



- La Δ_{4-5} isomérase change la position de la double liaison de 5-6 en 4-5 ;
- La 3- β -hydroxydéshydrogénase effectue une oxydation du radical 3 β -hydroxy en fonction 3-cétonique.

Figure 1.3 : Voie Δ_4 [18]

Au cours d'une seconde phase extramitochondriale, la prégnénolone subit l'action d'une 3β -hydroxystéroïde-déshydrogénase qui oxyde la fonction alcool 3β sur le C3 en fonction cétone, elle est accompagnée par une transposition de la double liaison 5-6 qui vient se placer en position conjuguée 4-5. Cette réaction est activée par la 3β -hydroxystéroïde-déshydrogénase qui a aussi un effet d'isomérase, pour former la progestérone. Celle-ci peut être transformée en 17-hydroxyprogestérone par une 17- α -hydroxylase qui peut agir avant ou après les deux enzymes précédentes (**Figure 1.4**) [19]



(OH : hydroxylase, HSD : hydroxystéroïde déshydrogénase, DES : desmélase, Cyp : cytochrome)

Figure 1.4 : Schéma général de la biosynthèse des hormones stéroïdes [19]

La progestérone est un précurseur jouant le rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse des estrogènes et des corticoïdes. Elle est formée à titre d'intermédiaire dans la biosynthèse de diverses hormones stéroïdiennes comme les hormones surrénaliennes, dans ce cas, ce stéroïde ne sort pas des cellules formatrices. Par contre, au niveau des cellules de la granulosa de l'ovaire, la progestérone est sécrétée dans la circulation sanguine [20].

Dans le sang, la progestérone est transportée liée à la corticosteroïd binding globulin (CBG) et l'albumine (approximativement 98%) et sous la forme libre [14]. La demi-vie de ces deux formes est de 20 à 30 minutes. Elle est métabolisée dans le foie par des hydrogénations successives de la double liaison 4-5 et des fonctions cétone en 3 et 19 d'où la formation du prégnandiol, qui sera conjugué par le foie avec l'acide glucuronique et éliminé par voie de la bile (30%) ou par voie urinaire (60 %), d'où elle repasse dans un cycle entérohépatique [21].

1.1.4. Actions physiologiques de la progestérone :

La progestérone est une hormone synthétisée essentiellement par le corps jaune des ovaires, avant l'ovulation, au niveau des cellules non vascularisées de la granulosa et après ovulation, au niveau des cellules lutéinisées de la granulosa. Le placenta, au niveau du syncytiotrophoblaste [22], prend le relais de façon plus au moins marquée selon les espèces, à partir d'un stade donné de la gestation [23]. Elle est donc présente dans le sang et/ou le lait pendant la phase lutéale du cycle œstral et lors de la gestation. Les surrénales et les testicules produisent aussi la progestérone, mais à de faibles quantités.

Son action au niveau de l'ovaire commence par activer une collagénase qui détruit les fibres de collagène et diminue ainsi la cohésion entre les cellules dans le follicule. La progestérone est sécrétée de manière croissante, et augmente aussi la sécrétion de liquide folliculaire, ce qui augmente les tensions dans le follicule, et augmente les forces de rupture d'où la libération de l'ovocyte, c'est la ponte ovulaire (**Figure 1.5**).

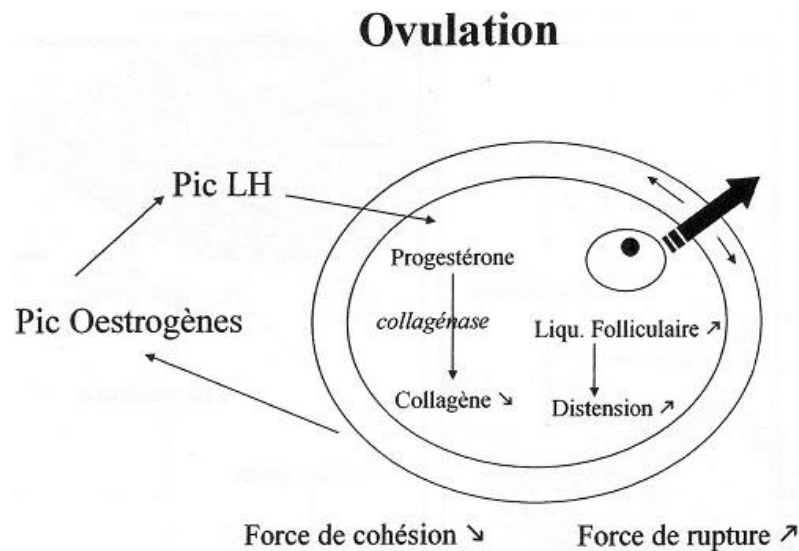


Figure 1.5 : Action de la progestérone sur l'ovulation

Au niveau de l'endomètre utérin, la progestérone prépare la muqueuse utérine à la nidation de l'œuf, en cas de fécondation, l'endomètre devient glandulaire, sa vascularisation s'enrichit et il y a des dépôts de glycogène. Elle assure l'absence des contractions rythmiques des muscles utérins.

La progestérone provoque le stockage de précurseurs d'acides gras dans l'endomètre. A partir de ces précurseurs, l'œstradiol induit la synthèse de prostaglandines utérines $\text{PGF}_{2\alpha}$, qui seront ensuite libérées par l'action de l'ocytocine lutéale sur ses récepteurs utérins. Leur effet lutéolytique aura pour conséquence d'un point de vue hormonal la diminution progressive de la progestéronémie [24].

Au niveau du col, elle provoque une sécrétion épaisse ou bouchon muqueux empêchant la progression des spermatozoïdes.

Au niveau des glandes mammaires, elle est responsable de la croissance des acini (important pour la lactogénèse)

Elle a aussi un contrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Elle agit sur les neurones de la GnRH en abaissant la fréquence des décharges de GnRH. Une progestéronémie élevée lors une phase lutéale, exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH, donc sur la libération de l'hormone LH. Il en résulte une réduction de la synthèse d'œstradiol par le follicule mature dominant et par conséquent, son atresie. Si la progestérone se maintient à un niveau élevé, une troisième vague de croissance folliculaire apparaît. Si par contre, la progestéronémie diminue alors que le follicule dominant de la deuxième vague est en phase de croissance, il ovule, et le cycle ne comporte que deux vagues [25].

1.1.5. Régulation et modifications hormonale au cours du cycle œstral chez la vache

Le cycle sexuel est caractérisé par deux phases bien distinctes. La phase folliculaire (pro-oestrus et oestrus) qui correspond d'un point de vue événements cellulaires ovariens à la croissance folliculaire terminale et à l'ovulation. La phase lutéale (metoestrus et le dioestrus) correspond au développement d'un corps jaune à partir du follicule qui a ovulé et régression de ce dernier en l'absence de la fécondation.

Durant un cycle, plusieurs vagues de croissance folliculaire sont entamées et le follicule ovulatoire est issu de la dernière vague. La variation de ce nombre de vagues détermine la longueur des cycles constatés [26].

Sur le plan hormonal, la régulation du cycle sexuel fait intervenir le système nerveux central (l'hypothalamo-hypophyse) et l'appareil génital (ovaire et utérus) (**Figure 1.6 et 1.7**).

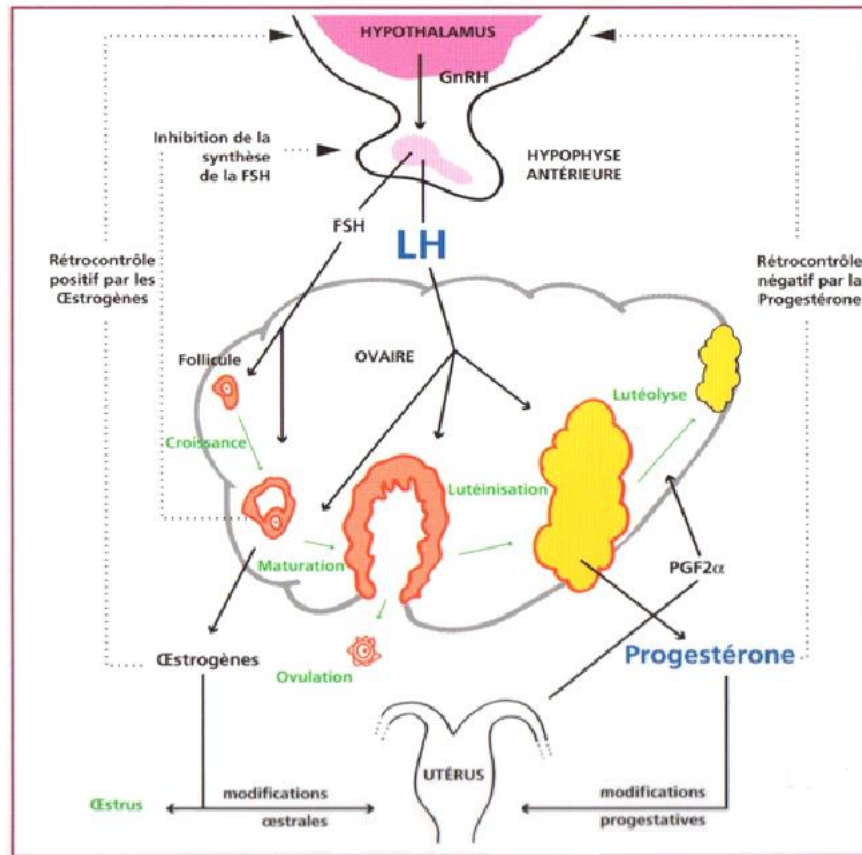


Figure 1.6 : Régulation hormonale du cycle oestral [27]

Durant le cycle ovarien, la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone ou gonadolibérine), qui est une hormone hypothalamique sécrétée de manière pulsatile, agit sur l'anté-hypophyse pour sécréter la FSH (Follicle Stimulating Hormone ou follitropine) et la LH (Luteinizing Hormone ou lutropine), qui à leur tour contrôlent la sécrétion des hormones ovariennes.

Le début de la phase lutéale est marqué par l'ovulation d'un follicule dominant ayant atteint la maturité (follicule de DeGraff). Elle se produit en moyenne 30 heures après l'augmentation des pulses et la décharge de la LH. Celle-ci assure la transformation de la thèque interne et de la granulosa du follicule en corps jaune. L'action de l'hormone hypophysaire (LH) persiste au niveau du corps jaune en stimulant la sécrétion de la progestérone, qui atteint des taux maximum au environ du 5^{ème} jour et à un degré moindre l'œstradiol. Les taux élevés de progestérone sécrétés (dioestrus), par rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, inhibent les sécrétions pré-ovulatoires de gonadotrophines (LH).

Sous l'action de la FSH hypophysaire, un groupe de follicules se développe au sein de l'ovaire (Recrutement) et assure leur croissance, elle stimule la conversion

d'androgènes en œstrogènes, qui agissent positivement sur la production de la GnRH et en synergie avec la FSH, stimulent le développement de la cavité antrale des follicules. Associée à la FSH, la LH stimule la production d'œstrogènes et d'inhibine par les grands follicules, qui induisent la diminution de la sécrétion de la FSH. Par la suite, la diminution du taux de FSH induit la sélection d'un follicule dominant, qui acquiert des récepteurs à LH (cellules de la granulosa) plus rapidement que l'ensemble des follicules subordonnés, ces récepteurs lui permettront de subsister à la chute des taux de FSH. Aussi, Le follicule dominant se maintient en entretenant sa sécrétion en œstradiol par acquisition d'un mécanisme d'autostimulation interne par l'intermédiaire de la synthèse d'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) [25, 28].

A ce stade de développement, le sort du follicule dominant dépend plus de la fréquence des pulses de la LH plasmatique que de la FSH. Si le follicule dominant croît en présence de taux élevés de progestérone plasmatique (dioestrus), en raison d'une faible fréquence des pulses de LH, il perd sa dominance et sa capacité de stéroïdogénèse, en plus d'une accumulation d'androgènes à cause du faible niveau de FSH, il décroît et devient atrétique. Les concentrations plasmatiques en œstrogènes et en inhibine deviennent faibles, entraînant une augmentation de la FSH plasmatique suivie d'une nouvelle vague folliculaire. Par contre, en absence de la progestérone, la fréquence des pulses de LH devient élevée, avec la FSH, ils stimulent le développement et la maturation du follicule dominant, qui secrète des concentrations élevées en œstrogènes induisant les chaleurs et déclenchent la décharge ovulatoire de LH. on constate que les modifications de la concentration en progestérone ont une double influence sur la croissance folliculaire et le principe du développement par vagues [25].

En l'absence d'une fécondation, un nouveau cycle ne peut commencer que lorsque le corps jaune du cycle précédant n'est plus fonctionnel. En effet, L'ocytocine, d'origine majoritairement post hypophysaire, intervient dans la lutéolyse cyclique, en synergie avec la prostaglandine F2 α et les œstrogènes folliculaires. L'ocytocine, synthétisée par les grandes cellules du corps jaune en fin de phase lutéale, se fixe à ses récepteurs sur l'endomètre utérin, dont la synthèse a été initiée par les œstrogènes sécrétés par le follicule pré ovulatoire, elle induit la production et la libération de la prostaglandine par l'utérus. Il en résulte la lutéolyse.

Dans le cas d'une gestation, le trophoblaste formé commence à sécréter à environ 15 jours de la gestation de la trophoblastine, dont le rôle est d'inhiber la sécrétion de la PGF2 α . Le corps jaune formé se transforme en CJ gestatif, sécrétant de la progestérone pendant toute la durée de la gestation. Celle-ci inhibe toute décharge de LH et il ya atrésie du follicule dominant [29].

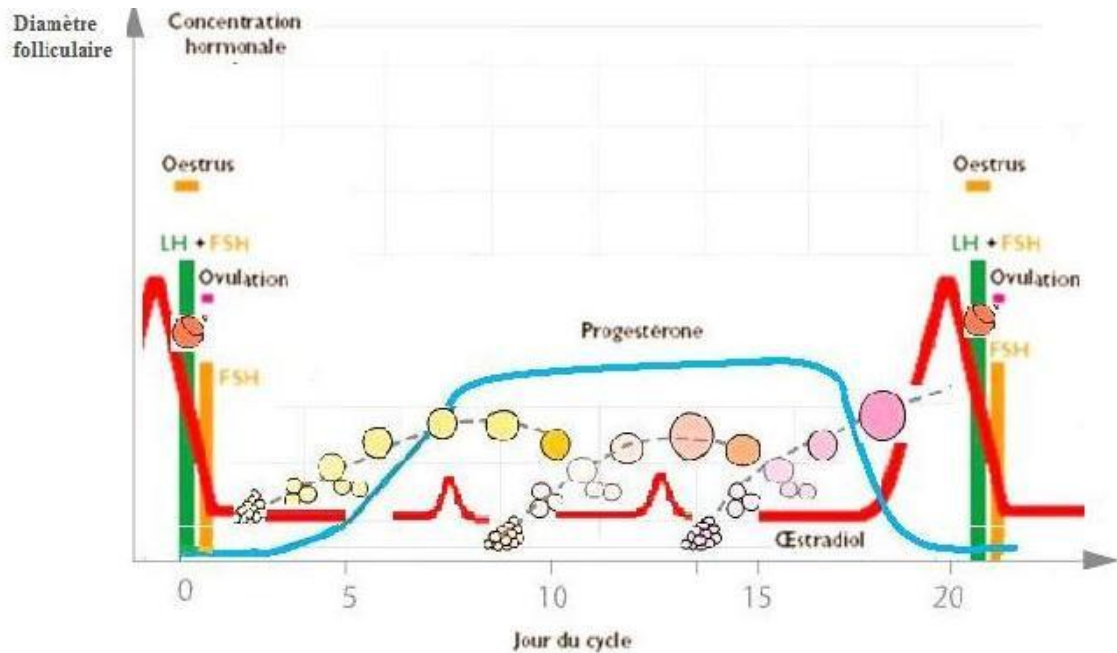


Figure 1.7 : Schéma des modifications folliculaires et des concentrations hormonales plasmatiques chez la vache

Le **tableau 1.1** montre les principaux paramètres de cycles œstraux chez quelques ruminants [30].

Tableau 1.1 : Paramètres des cycles œstraux chez quelques ruminants [30]

Espèces		Vache	Brebis	Chèvre	Jument
Phase folliculaire	Pro-oestrus (j)	2-3	2-3	3	2-5
	Oestrus (h)	12-18	24-36	24-40	144 (72-240)
Phase lutéale	Metoestrus (j)	2	2	16	2
	Dioestrus (j)	15	10-12		13-23
Durée du cycle (j)		21	17	20-21	21
Moment de l'ovulation/début oestrus (h)		10-12	30-40	24-45	144

1.1.6. Evolution de la progestérone dans les matrices sang et lait :

La concentration en progestérone dans le sang et/ou le lait est caractéristique de l'état physiologique des femelles de l'élevage [31]. Elle évolue au cours du cycle œstral sous la dépendance des gonadotrophines, elle est à son niveau inférieur pendant la période péri-ovulatoire (phase folliculaire), puis augmente graduellement pendant les premiers jours qui suivent l'ovulation correspondant au stade metoestrus, pour atteindre un plateau, qui persiste pendant le stade dioestrus de la phase lutéale (**Figure 1.7**). A l'état gravide, le taux de

progestérone reste élevé pendant toute la gestation, alors que pendant l'anoestrus vrai, il est à son niveau le plus bas.

Les seuils en progestérone dans le sang et le lait écrémé déterminant les différents états physiologiques sont illustrés par le **tableau 1.2**. Ils sont communs à toutes les bibliographies.

Tableau 1.2 : Niveau de progestérone (ng/ml) dans le sang ou le lait écrémé en fonction de l'état physiologique de la femelle [31]

Espèces	Phase folliculaire		Phase luthéale		Gestation	Inactivité ovarienne
	Sang	lait écrémé	sang	lait écrémé		
Vache, Brebis Chèvre, Jument	0.5-1	< 1-2	> 1	> 1-2	> 2	< 1

La progestérone est un stéroïde qui peut être dosée dans plusieurs milieux biologiques [32,33,34]. Cependant en médecine vétérinaire, le sang (plasma/sérum) et le lait (entier/écrémé) représentent les fluides les plus utilisés en immunodosage, avec une préférence pour la matrice lait chez les femelles en lactation, en raison de la facilité de l'échantillonnage, celui-ci n'engendre aucun stress à l'animal prélevé [35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].

Les concentrations de progestérone mesurées dans le sang reflètent fortement celles mesurées dans le lait écrémé [42] ($r=0.95$), [43] ($r=0.88$). Cependant, étant donné sa nature lipophile, la progestérone est présente en concentration plus élevée dans le lait entier par rapport au lait écrémé [44, 45, 46].

Par ailleurs, les conditions dans lesquelles est effectué l'échantillonnage de sang ou le lait (lieu et moment de prélèvement, les conservateurs utilisés) et le procédé de stockage des échantillons (nature, température et durée de stockage de l'échantillon juste après le prélèvement, pendant son acheminement au laboratoire, au niveau du laboratoire pendant sa centrifugation et avant le dosage) constituent des facteurs de variations de la concentration de progestérone. Pour cela, il importe d'homogénéiser ces paramètres pendant toute la durée de l'expérimentation et de choisir un schéma d'échantillonnage qui permet d'assurer la conservation la plus longue possible de la progestérone dans la matrice de dosage.

Dans le cas du lait, le froid intense détruit les globules gras de la structure du lait de suite d'une cristallisation des triacylglycerols ou d'une pénétration des cristaux de glace dans les membranes primaires des globules gras du lait [47]. Ainsi, la concentration de progestérone dans le lait écrémé est fortement augmentée quand l'échantillon de lait entier est préalablement stocké à de basses températures (0°C et 4°C) avant centrifugation et à mesure que la durée de stockage augmente [48,49]. Le froid semble diminuer la solubilité de la progestérone dans la fraction grasse du lait. Les échantillons de lait entier et de lait écrémé doivent être dosés dans les quelques heures qui suivent la collecte, si non l'ajout d'un conservateur est obligatoire [50]. Aussi, les premiers jets de lait doivent être éliminés et un échantillon de lait représentatif des quartiers seins doit être collecté. Quant au moment de l'échantillonnage, qu'il soit avant ou après les traites, il doit être maintenu pendant toute l'étude, car la concentration de la progestérone est fortement liée au taux de matière grasse du lait [49].

Pour remédier au problème de dégradation des prélèvements de lait entier pendant le transport, Samsonova et al. 2014 ont proposé de doser la progestérone chez les bovins dans des échantillons de lait séchés sur membranes poreuses [51].

Dans le cas du sang entier, il a été montré que les enzymes présents dans des globules rouges du sang occasionnent une perte de la progestérone dans le cas d'échantillons de plasma non séparés. Delahaut et al. 1979, préconisent de centrifuger les prélèvements de sang sans conservateur dans l'immédiat à 4°C ou l'ajouter de l'équivalent de 5mg/ml de sang, d'Azide de sodium, il permet de conserver 90% de la progestérone après quatre (04) jours de conservation à 20-22°C [52].

Pulido et al.1991 [53], ont observé dans des échantillons de sérum et de plasma héparinés, conservés avant centrifugation à des températures respectivement de 4°C, 17°C et 37°C, des chutes significatives du taux de progestérone à partir de 5h, 3h et 2h d'incubation pour le sérum et 6h, 2h et 1h d'incubation pour le plasma. Les mêmes observations ont été décrites par Inns et al.1989 [54].

Tahir et al. 2013, n'ont pas enregistré d'effet significatif des différents agents anticoagulant testés (silicone, lithium héparine et EDTA) sur la concentration de la progestérone [55].

1.2. INTERET DU DOSAGE DE LA PROGESTERONE CHEZ LES FEMELLES D'ELEVAGES :

La progestérone est une hormone dite de la reproduction. Sa variation chronologique au cours du cycle œstral, a fait de son dosage un outil fiable de suivi et de détermination du statut physiologique des femelles d'élevage. Les délais entre les prélèvements et leur nombre dépendent des informations disponibles sur la conduite du troupeau [31]. Le dosage de la progestérone dans le lait et/ou le sang chez diverses espèces animales a été utilisé à différentes fins :

- pour étudier la cyclicité des femelles pendant les saisons [56, 57]
- déterminer l'entrée en puberté des jeunes femelles [58, 59, 60]
- la mise en évidence d'une activité ovarienne chez les femelles cyclées [36, 39, 61, 62, 63, 64, 65]
- suivi de la reprise de l'activité ovarienne post-partum [33,38, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72]
- appuis pour l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire [40, 41, 73, 74, 75, 76, 77]
- diagnostic précoce de non gestation et suivi de la gestation [78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85]
- évaluation de l'efficacité des traitements hormonaux [37, 86, 87, 88, 89, 90]

La **figure 1.8** illustre quelques exemples typiques de profils progestéronémiques post-partum obtenus chez des vaches.

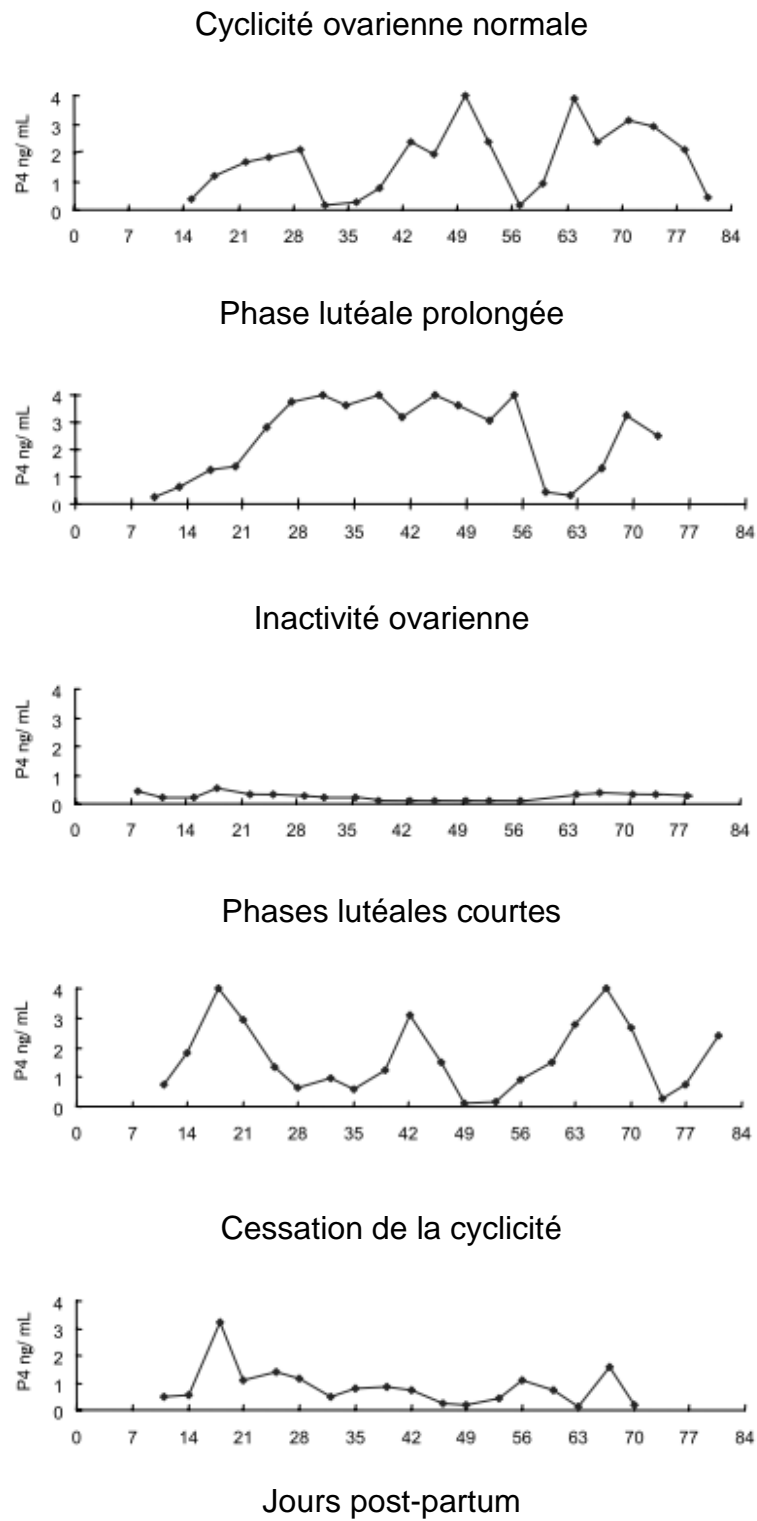


Figure 1.8 : Exemples typiques de profils progestéronimiques chez la vache [91]

1.3 TECHNIQUES DE DOSAGE DE LA PROGESTERONE :

1.3.1 Historique du dosage :

Les premiers dosages de la progestérone ont débuté vers le début des années 60 avec le développement des méthodes de séparation chromatographique, peu spécifiques et la sensibilité de l'ordre du μg , mais nécessitant des volumes sanguins non négligeables (chromatographie sur papier et chromatographie sur couche mince) [92].

Pendant la période 1960-70, sont apparues la méthode de double dilution isotopique [93] et la chromatographie en phase gazeuse (GC) [94]. Cette dernière technique de séparation a progressé avec l'apparition de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [95], qui par la suite a été couplée avec un spectroscope de masse (LC-MS/MS) [92, 96] ou (GC-MS/MS) [97]. Ces méthodes de dosage bien qu'elles soient efficaces pour la détermination de faibles doses de progestérone, elles sont cependant très coûteuses pour un dosage de routine [98].

Parallèlement aux méthodes chromatographiques, la période 1860-1935 a connu l'apparition des méthodes immunologiques, avec la découverte de l'anticorps et des réactions d'immunoprécipitation induites par l'antigène en présence de son anticorps spécifique.

En 1953, Yalow et Berson [12] décrivaient pour la première fois le dosage radio-immunologique par compétition (Prix Nobel de médecine YALOW, GUILLEMIN, SCHALLY en 1977). En 1968, Miles et Hales [99] marquent l'anticorps et exposent la méthode de dosage immunoradiométrique (IRMA).

En 1975, Köhler et Milstein [100] ont obtenu des anticorps monoclonaux dont l'utilisation a amélioré la spécificité et la sensibilité des techniques. Dès 1968, l'évolution des techniques d'immunodosage a porté essentiellement sur le type de marqueur utilisé et l'automatisation du dosage.

L'immunodosage était dans un premier temps dominé par les trousseaux avec un traceur radioactif (RIA). Les contraintes engendrées par l'utilisation de radioéléments ont poussé les scientifiques à utiliser d'autres marqueurs non isotopiques tels les enzymes (EIA) [99, 100], la fluorescence (FIA) [103, 104] et la chimiluminescence (CLIA) [105]. Malgré tout, les dosages RIA restent encore les plus utilisés pour des raisons de coût et de simplicité [106].

1.3.2. Les dosages immunologiques :

1.3.2.1. Bases physico-chimiques du système antigène-anticorps :

a) Les liaisons antigène-anticorps :

Les immunodosages regroupent l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène-anticorps [107] (**Figure 1.9a**). Les antigènes sont des molécules complexes (naturelles ou synthétiques) capables de mobiliser le système immunitaire et de provoquer une réaction immunitaire. Ils peuvent être complets, pouvant stimuler la prolifération des lymphocytes et la production des anticorps spécifiques (immunogénicité) et interagir avec ces derniers (réactivité) ou incomplets, comme les haptènes. Ces petites molécules (< 5000Da) possèdent la propriété de réactivité antigénique, mais sont non immunogéniques, à moins d'être couplés à des protéines porteuses (carriers). Les parties antigéniques d'un antigène complet sont appelées déterminants antigéniques, ou épitopes.

Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines présentes en forte concentration dans le sang et les liquides interstitiels et les sécrétions des mammifères. Ils sont produits par les plasmocytes (lymphocytes B différenciés) en réponse à l'intrusion dans l'organisme d'un antigène. Les immunoglobulines sont les récepteurs d'antigène, dont le site de liaison à l'épitope s'appelle le paratope.

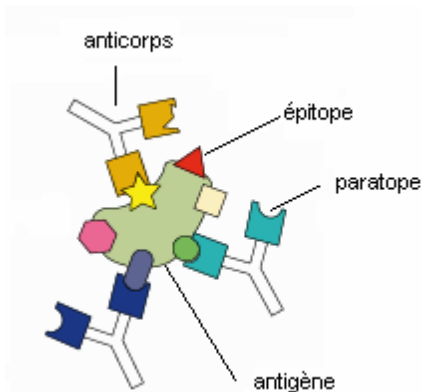


Figure 1.9a : schéma de l'interaction entre un antigène et différents anticorps

Le système antigène-anticorps obéit aux mêmes principes de l'interaction ligand-récepteur. Il est caractérisé par la capacité de liaison réversible et met en jeu des liaisons non covalentes de faible énergie. Ces forces mises en jeu dans les liaisons Ag-Ac, sont de quatre types et sont, de la plus forte à la plus faible (**Figure 1.9b**):

- * **forces électrostatiques** ou **ioniques** qui s'exercent entre deux groupements ioniques de charge opposée ; par exemple NH_3^+ et COO^- .
- * **liaison hydrogène**, forment un pont entre atomes électropositifs (hydrogène) et électronégatifs (oxygène, azote). Elles sont stabilisées par la présence d'eau et diminuent avec la température.
- * **liaisons hydrophobes** qui se forment entre des groupements chimiques hydrophobes, qui repoussent les molécules d'eau.
- * **forces de Van der Waals** représentent l'interaction entre les nuages électroniques de deux atomes (mouvement des électrons entre deux molécules). Elles sont très peu énergétiques.

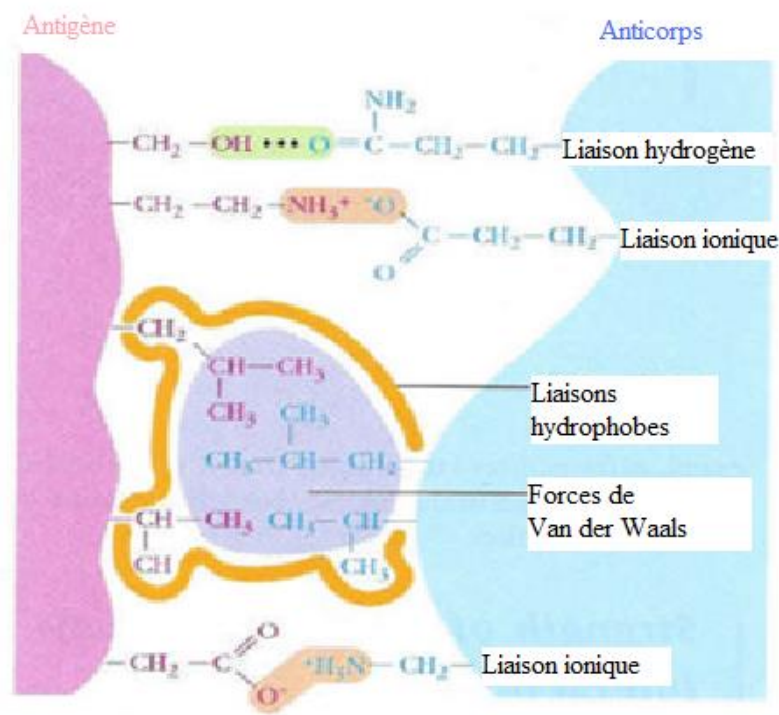


Figure 1.9b : Schéma des liaisons entre un antigène et un anticorps

La force de liaison varie en fonction de la distance entre les molécules d'antigène et d'anticorps, leur complémentarité dans l'espace et des aires de contact étendues.

La stabilité de toutes ces liaisons non covalentes est influencée par les molécules en présence, les conditions physico-chimiques du milieu dans lequel a lieu la réaction et de la température.

La réaction Ag-Ac dépend du point de vue thermodynamique de l'affinité : force de liaison entre un épitope et son paratope. Elle est réversible et exothermique libérant de la chaleur (2 à 40KCal.M-1) :



b) Propriétés de la liaison Antigène/Anticorps :

i. Affinité :

L'affinité de l'anticorps est une mesure de la force de liaison (attraction et répulsion) entre un épitope unique et un paratope, (**Figure 1.10**)

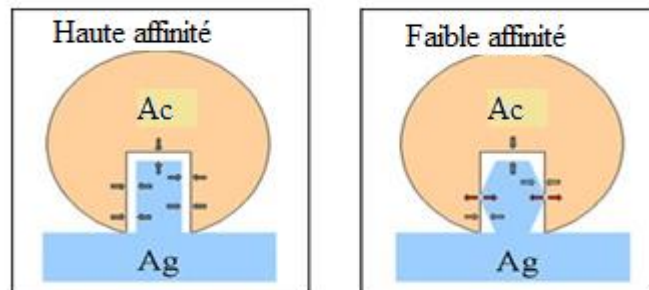


Figure 1.10 : Schéma démonstratif de l'affinité antigène-anticorps

Elle peut être estimée quantitativement à travers l'évaluation de la constante d'association intrinsèque ou constante d'affinité à l'équilibre. Cette réaction, qui obéit à la loi d'action de masse, est réversible et on obtient un équilibre lorsque la quantité de complexe Ag-Ac formé par unité de temps est égale à la quantité de ce même complexe dissocié par unité de temps.

Le modèle mathématique de la loi d'action de masse peut s'écrire :



Ag : concentration molaire de l'antigène

Ac : concentration molaire de l'anticorps

Ag-Ac : concentration molaire du complexe Ag-Ac

k_{ass} : constante cinétique d'association

k_{diss} : constante cinétique de dissociation

Vitesse d'association : $V_1 = [Ag][Ac] \times k_a$

(nombre de phénomène de liaison par unité de temps)

Vitesse de dissociation : $V_{-1} = [Ag-Ac] \times k_d$

(nombre de phénomène de dissociation par unité de temps)

A l'équilibre, $V_1 = V_{-1}$, on a

$$[Ag] [Ac] \times k_a = [Ag - Ac] k_d$$

$$\frac{[Ag - Ac]}{[Ag] [Ac]} = \frac{k_a}{k_d} = K_a$$

K_a = constante d'affinité (d'un paratope pour un épitope) exprimée en litre M^{-1}

$K_d = 1/K_a$ (constante de dissociation qui est l'inverse de K_a , exprimée en moles/litre)

Par convention, l'affinité est exprimée par la mesure de la constante de dissociation K_d . Plus l'affinité de l'interaction Ag-Ac est grande, plus K_a est élevé, plus le complexe est stable. On considère généralement que l'anticorps possède une bonne affinité pour l'antigène lorsque K_a est supérieur ou égal à $10^9 M^{-1}$.

K_a est évalué à l'équilibre par la méthode de Scatchard [108].

ii. la valence d'un anticorps :

Elle représente le nombre de sites antigéniques identiques aux quels peut se lier un anticorps. Plus ce nombre est élevé, plus l'interaction Ag/Ac est élevée. Ainsi, l'IgG à 2 sites et l'IgM à 10 sites.

iii. *Avidité de l'anticorps :*

L'avidité est une mesure de la force globale de la liaison antigène/anticorps ; elle dépend de l'affinité des liaisons paratope/ épitope et de la valence de l'anticorps. Si plusieurs liaisons se forment, la force de liaison est plus importante. Par conséquent, l'avidité est généralement plus grande que l'affinité.

L'affinité fait donc référence à la force de liaison entre un déterminant antigénique unique et un site anticorps individuel alors que l'avidité fait référence à la force globale de la liaison entre les antigènes et les anticorps multivalents (**Figure 1.11**).

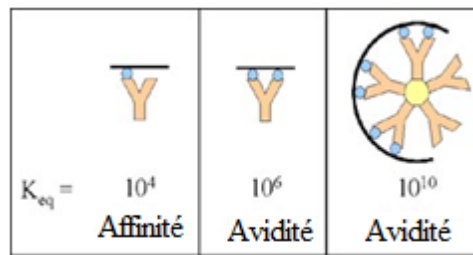


Figure 1.11 : Schéma démonstratif de l'avidité d'un anticorps-antigène

iv. *Spécificité et cross-réactivité :*

La spécificité fait référence à la capacité d'un site anticorps donné à réagir avec un seul déterminant antigénique ou encore à la capacité d'une population d'anticorps polyclonaux à réagir avec un seul antigène. La spécificité d'un dosage est son aptitude à mesurer seulement l'analyte désiré, même en présence de quantités importantes de substances de structure voisine. Il peut exister toujours des réactions croisées, ou l'anticorps reconnaissent avec des affinités plus ou moins importantes des molécules de structure voisine (**Figure 1.12**).

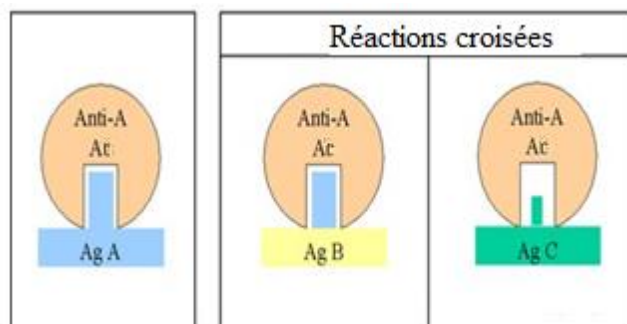


Figure 1.12 : Schéma démonstratif des liaisons croisées de l'anticorps

1.4. LE RADIOIMMUNODOSAGE (RIA) :

1.4.1 Principe de la méthode :

Lorsque l'on met en présence un anticorps (Ac), son antigène spécifique froid (Ag) et ce même antigène marqué (Ag^*), il peut se créer deux types de complexe selon que l'anticorps se fixe à un des antigènes : Ac-Ag et Ac- Ag^* (**Figure 1.13**).

Le principe de ce dosage est basé sur la compétition qui se crée entre les deux formes d'antigène pour leur anticorps spécifique. Dans le cas d'une estimation quantitative, la concentration en anticorps et en molécule marquée est maintenue fixe alors que celle de l'antigène froid est augmentée. Cette croissance de la concentration en antigène entraîne l'augmentation de la concentration en complexe antigène-anticorps au détriment de la formation du complexe antigène marqué-anticorps. Une fois l'équilibre est établi, c'est-à-dire, que la totalité des sites d'anticorps disponibles est liée, on mesure la fraction liée, qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser.

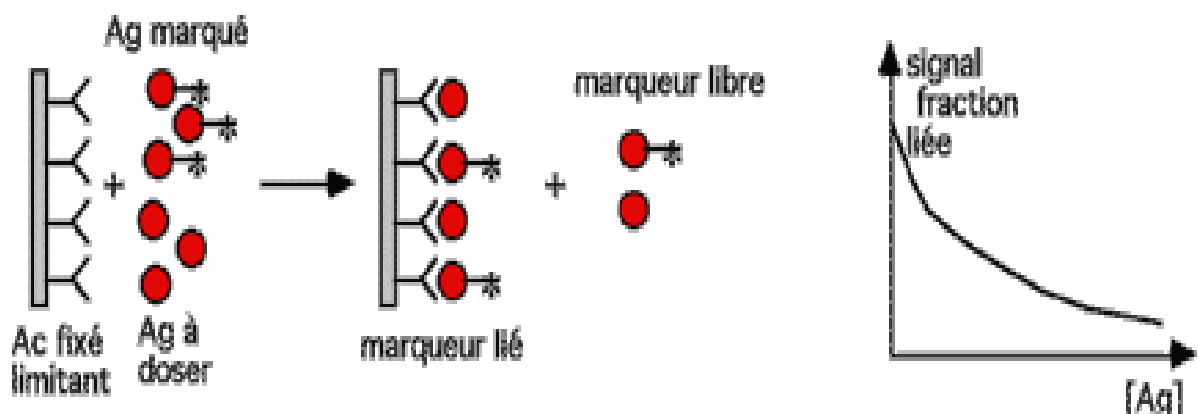


Figure 1.13 : représentation schématique du principe du radioimmunos dosage par compétition [109].

Une fois le signal radioactif émis par la fraction liée (complexe antigène marqué-anticorps) est mesuré, on peut tracer la courbe d'étalonnage.

L'une des méthodes de calcul utilisée lors d'un dosage RIA pour la linéarisation de la courbe de la gamme étalon, sous la forme d'une droite, caractérisée par une équation de type ($y=ax + b$), est une représentation de ces variables sous la forme :

$$\text{Logit } ([Ag^* - Ac]) = f(\log [Ag])$$

On représente en abscisse $x = \log_{10}$ de la concentration de antigène froid et en ordonnée $y = \text{Logit } (B/B_0)$ où le $\text{Logit } (B/B_0) = \ln [(B/B_0) / (100 - B/B_0)]$

Après linéarisation de la courbe, les concentrations inconnues sont directement lues par extrapolation. Actuellement, plusieurs logiciels de traitement des données RIA existent (Logit-log, fonction spline, modèle à quatre paramètres). Ces programmes sont directement reliés de l'ordinateur au compteur gamma.

1.4.2. Constituants d'une trousse RIA :

Les trousse de radioimmunodosages par compétition sont constituées de différents composants dont :

- le traceur (analyte marqué),
- le système de séparation des formes libres et liées, composé de tubes revêtus d'un anticorps spécifique à l'analyte,
- les étalons préparés dans une matrice adéquate en respectant les critères d'identité de la structure à doser.

1.4.2.1. Le traceur radiomarqué :

Le radiomarquage est le procédé par lequel on obtient des molécules radiomarquées. Il comprend trois étapes qui sont le marquage proprement dit, c'est-à-dire la fixation du radionucléide sur la molécule, la purification du substrat marqué et on termine par une caractérisation du traceur obtenu.

- la caractérisation du traceur obtenu.

a) Le choix du radiomarqueur :

Le choix du radiomarqueur utilisé pour marquer les molécules est guidé par deux objectifs qui sont l'obtention d'un traceur doté d'une haute activité spécifique et une modification minimale des propriétés immunochimiques ou physicochimiques de la molécule marquée.

Initialement, le tritium (^3H), émetteur bêta, a été longuement utilisé pour marquer les stéroïdes. Par la suite, les caractéristiques de plusieurs radio-isotopes de l'iode, émetteurs gamma, tels que ^{123}I , ^{125}I et ^{131}I ont permis leur utilisation dans la recherche biochimique et pharmaceutique, la radioimmunoanalyse et la médecine nucléaire.

Parmi ces radio-isotopes, l'iode 125 est le privilégié en radioanalyse, pour l'iodation des hormones protéiques et polypeptidiques [110]. Ces avantages par rapports aux autres radiomarqueurs sont :

- l'iode 125 (Na^{125}I), est une molécule peu coûteuse, assez peu ionisante, mais suffisamment énergétique (35 Kev) pour que le rayonnement émis soit mesurable.

- il provient généralement du bombardement du xénon par des neutrons dans un réacteur ; son abondance isotopique est supérieure à celle de l'iode 131, 95 % et 20 %, respectivement.
- l'activité spécifique (AS) d'une molécule marquée à ^{125}I est assez élevée 81.4 TBq/mmol-1. Des traceurs avec des AS trop élevées (592 TBq/mmol-1 pour ^{131}I) risqueraient de diminuer l'immunoréactivité de l'antigène marqué et de provoquer des phénomènes de radiolyse (*iodination damage*) et des traceurs avec des AS faibles (1.11 TBq/mmol-1 pour ^3H) sont inutiles à la radioanalyse.
- sa demi-vie de **60 jours** est 73 fois plus courte que celle du ^3H (12,3 ans) et environ 8 fois plus longue que celle de ^{131}I . Elle est assez longue pour permettre une conservation du produit marqué et assez courte pour l'élimination des déchets. Tous les 60 jours, la radioactivité des déchets iodés sera diminuée de moitié.
- c'est un émetteur γ , ce qui facilite la détection du rayonnement émis.
- Le rendement de conversion électrochimique sur film photo de ^{125}I est de 3-10 % (selon le type de film) alors que celui du tritium est inférieur à 1%. L'image sera obtenue 200-500 fois plus vite avec un ligand iodé qu'avec ^3H .

b) Procédures de marquage à l'iode (NaI^{125}) :

i. Les molécules à marquer :

Dans le cas d'un radioimmunos dosage, sur le plan propriétés chimiques des molécules, il doit y avoir identité totale entre la molécule marquée et l'analyte à doser. Quant à la procédure à adopter pour le marquage, elle dépend de la structure de la molécule à marquer, deux cas peuvent se présenter [110] :

- soit, le substrat contient un ou plusieurs atomes d'iode, qu'il suffit de substituer par de l'iode radioactif, c'est le cas des hormones thyroïdiennes T3 et T4 (**Figure 1.14**) :

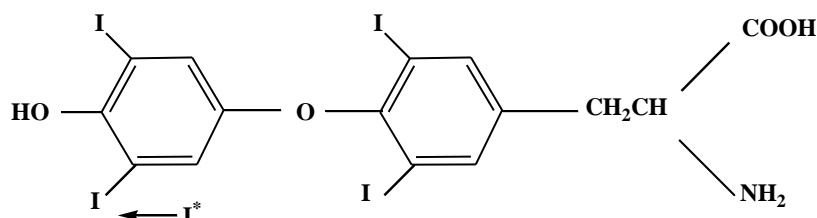


Figure 1.14 : Structure de l'iodothyronine [110]

— soit, on substitue un ou plusieurs atome(s) d'hydrogène par des atomes d'iode, sur un noyau aromatique, en général, sur le noyau phényle des résidus tyrosyles, sur un hétérocycle ou sur un groupement thiol (**Figure 1.15**). Cette substitution est directe ou indirecte, selon que la molécule à marquer possède ou non ce type de groupement.

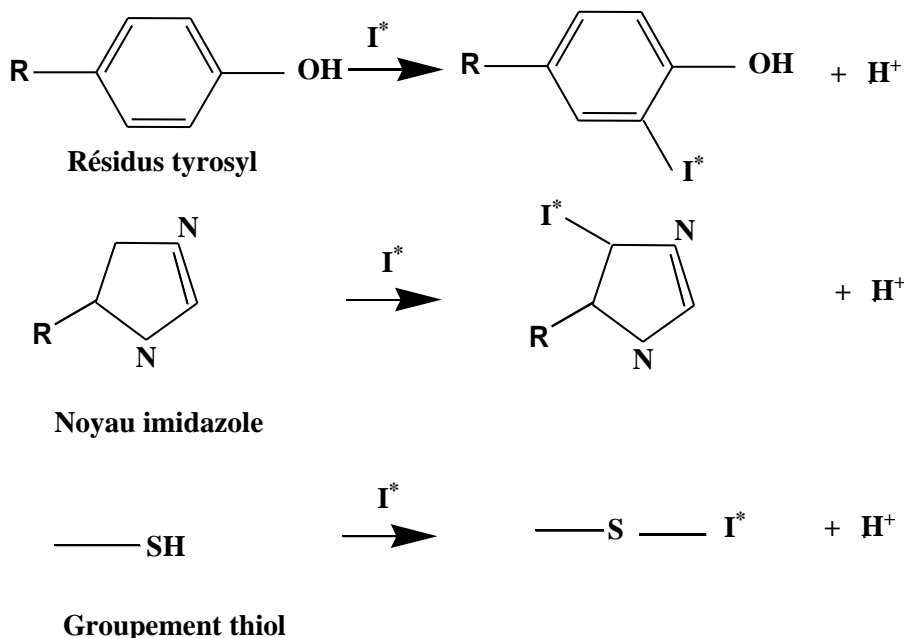


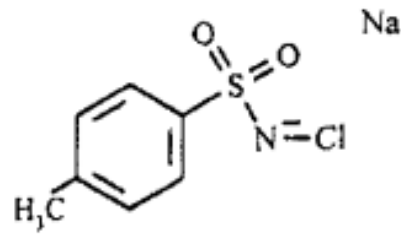
Figure 1.15 : Résidus susceptibles d'être iodés par substitution [110]

ii. Voies d'oxydation de l'iode lors d'un marquage :

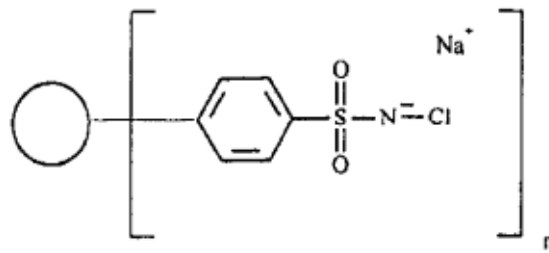
Pour que l'iode puisse réagir au cours d'une substitution électrophile, celui-ci doit être dans les états d'oxydation actif I^0 et I^+

L'iode actif, (I^0 ou I^+), provient de l'oxydation de l'iodure radioactif commerciale (I^-), non réactif ; cette oxydation peut être réalisée :

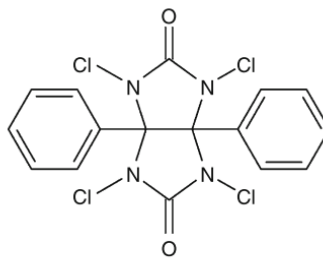
— **par voie chimique** (**Figures 1.16 et 1.17**), en milieu liquide, en présence d'un agent oxydant telle que la chloramineT (N-chloro-p-toluène sulfonamide de sodium), le monochlorure d'iode (ICl), le N-bromosuccinimide et l'hypochlorite de sodium, un agent réducteur comme le métabisulfite de sodium ou la cystéine est nécessaire pour stopper l'oxydation. En milieu solide, l'agent d'oxydation est fixé sur une bille de polystyrène, tel que le Iodobread (N-chlorobenzène sulfonamide), ou absorbé sur un tube à essai tel que le Iodogen (tétrachloro 1, 3, 4,6-diphényl 7-8 acétylène), l'agent réducteur n'est pas nécessaire car la réaction d'oxydation est stoppée en récupérant la phase liquide [111, 112, 113, 114,115].



La chloramine T



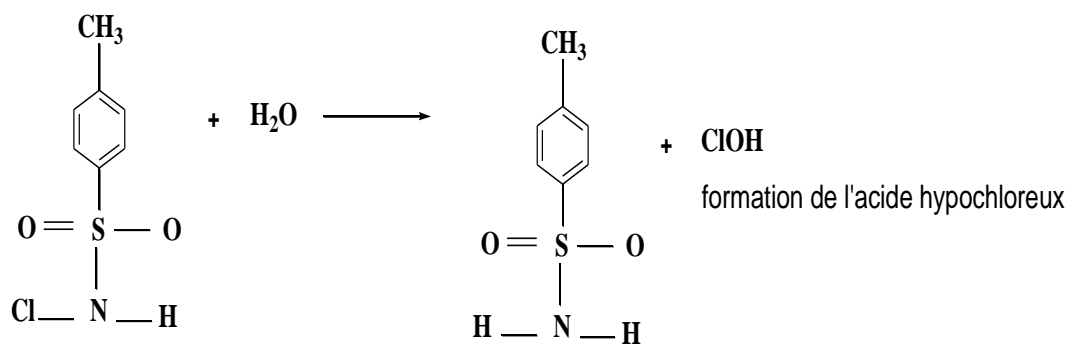
L'iodobread (N-chlorobenzène sulfonamide)



Iodogen™
Chemical structure of Iodogen,
1,3,4,6-Tetrachloro-3,6-diphenylglycoluril

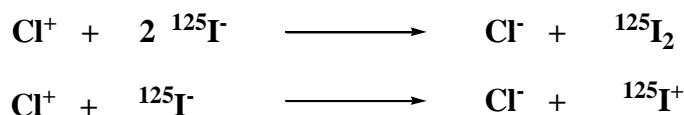
Figure 1.16 : Les agents d'oxydation [116]

1- Formation d'ion Cl^+ à partir de la Cloramine T en présence de l'eau



C'est l'acide hypochloreux, ClOH, grâce aux ions Cl⁺ libérés en présence d'eau, qui agit comme oxydant.

2-Oxydation de l'iodure (I⁻) en iode actif (I⁰ ou I⁺)



3- Réduction de l'excès d'iode par le métabisulfite de sodium

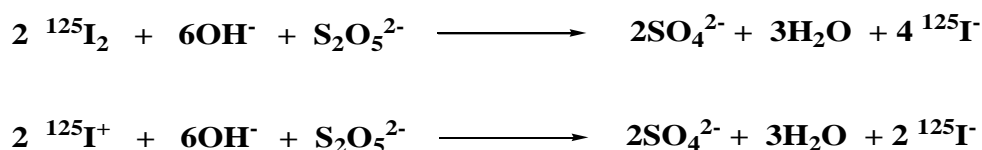


Figure 1.17 : Principe de marquage à l'iode 125 par la méthode à la chloramine T [114]

— **par voie enzymatique (Figures 1.18)**, en milieu liquide ou solide, en présence d'une enzyme telle que la lactopéroxydase, utilisée afin de transformer ¹²⁵I⁻ en ¹²⁵I₂. Cette méthode a été introduite par Marchalonis J.J en 1969. La réaction d'oxydation de I⁻ en iode actif (I⁺ ou I⁰) est enclenchée par l'addition du peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée = H₂O₂) à l'enzyme. L'ajout d'un agent réducteur n'est pas nécessaire, la réaction est arrêtée par dilution du milieu réactionnel [112,114].

L'action oxydante de ce couple H₂O₂ – lactoperoxydase, épargnant la molécule à marquer, a fait que cette technique est très utilisée dans le marquage de substances très fragiles telles que les haptènes (TSH, LH, progestérone...) Cette méthode est d'un meilleur rendement lors des marquages des résidus tyrosyls par rapport aux sites histidines

Oxydation de I⁻ en I⁰ lors d'un marquage à la lactoperoxydase

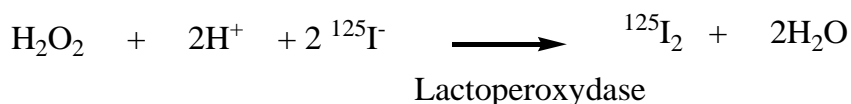


Figure 1.18 : Principe de marquage à l'iode 125 par oxydation à la peroxydase [114]

c) Radiomarquage des protéines et des haptènes :

i. Radioiodination direct :

La radioiodination direct par substitution électrophile (**figure 1.19**), est une méthode utilisée avec les protéines possédant un des groupements pouvant fixer l'iode, tel les groupements phénoliques des tyrosines ou imidazoles des histidines (**Figure 1.20**). Elle doit être rapide, douce et facile et doit aboutir à un traceur ayant une pureté radiochimique et une activité spécifique élevée. Ce procédé de marquage direct utilisant l'oxydation à la chloramine T est aussi connue sous le nom de méthode de Hunter and Greenwood (1962) [117]. Il est le plus utilisée pour le radiomarquage des protéines. La chloramine T (CAT), est un agent d'oxydation doux à température ambiante, dans des conditions neutres ou basiques. Cependant, le Cl^+ étant un oxydant très énergétique, le temps de contact de la protéine à marquer avec cet agent d'oxydation doit être court et la concentration en CAT utilisée doit être la plus basse possible, afin d'éviter toute détérioration de la protéine à marquer [118, 117, 120].

A l'exception de certaines hormones thyroïdiennes qui peuvent être radioiodées par substitution de l'atome d'iode par un autre iode radioactif, les haptènes doivent être greffées préalablement d'un bras. Ce dernier doit contenir un groupement pouvant être radioiodé ultérieurement [121, 122, 123, 124, 125]. Le couplage des haptènes aux bras se fait en faisant intervenir la fonction amine du bras et le groupement carboxyle de l'haptène, s'il n'en dispose pas, il est nécessaire de lui en greffer un au préalable par un procédé de synthèse organique.

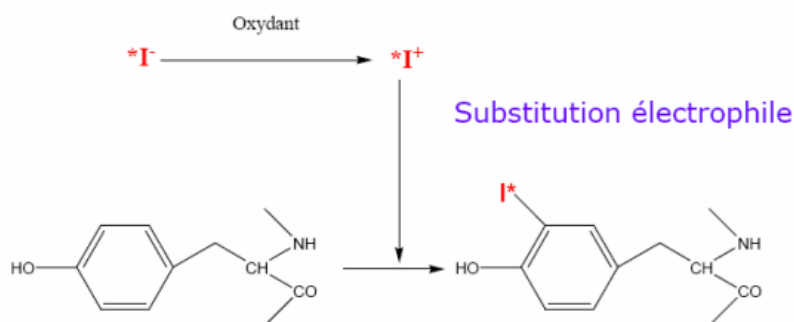


Figure 1.19 : La radioiodination direct par substitution électrophile

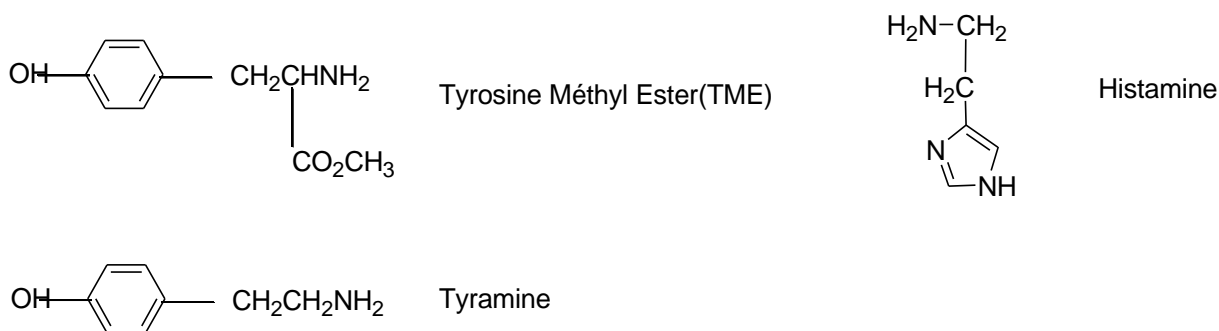


Figure 1.20 : Résidus pouvant être iodés

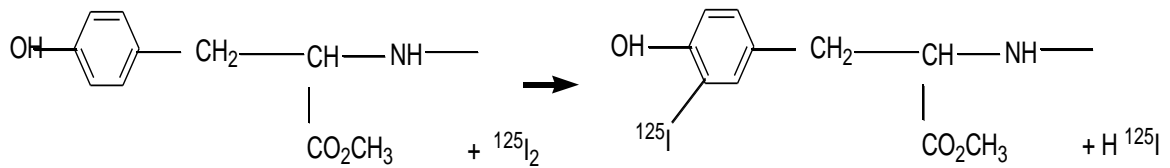
ii. Radioiodination indirect :

Si la molécule à marquer ne possède pas de groupements adéquats pouvant permettre un marquage direct de l'iode (exemple des hormones stéroïdiennes, ou des haptènes en général), celle-ci doit être greffée d'un chaînon ou ligand ou bras disposant de résidus qui sont préalablement radioiodés, c'est la radioiodination indirect par couplage [115, 119, 120]. Celle-ci présente l'avantage de ne pas oxyder le substrat à marquer, en préservant les fonctions biologiques des protéines ou peptides et le rendement de marquage et l'activité spécifique obtenue sont élevés. Ces techniques sont généralement adoptées pour le cas de marquages de molécules très sensibles à l'oxydation. Ces ligands radiomarqués sont obtenus soit par voie commerciale ou préparés au laboratoire, dans ce cas, ils sont purifiés avant la conjugaison à la molécule à marquer. Les exemples 1-3 représentent des cas de radioiodination indirecte.

Exemple 1 : cas de *Résidus tyrosyles (tyrosine Méthyl Ester : TME)*

Ce procédé de marquage est très utilisé pour le marquage des stéroïdes destinés pour le radioimmunodosage. Le principe consiste à radioioder le résidu TME par la méthode de Chloramine T de Hunter et Greenwood, d'activer le groupement COOH de la protéine ou le stéroïde par la formation d'anhydride mixte sous l'effet de l'isobutylochloformate en présence de la 4 méthylmorpholine à basse température (**Figure 1.21**).

- Fixation de l'iode sur le noyau phényle des résidus tyrosyles de la molécule à marquer



- Greffage du TME sur un résidu protéique de la molécule à marquer préalablement activée

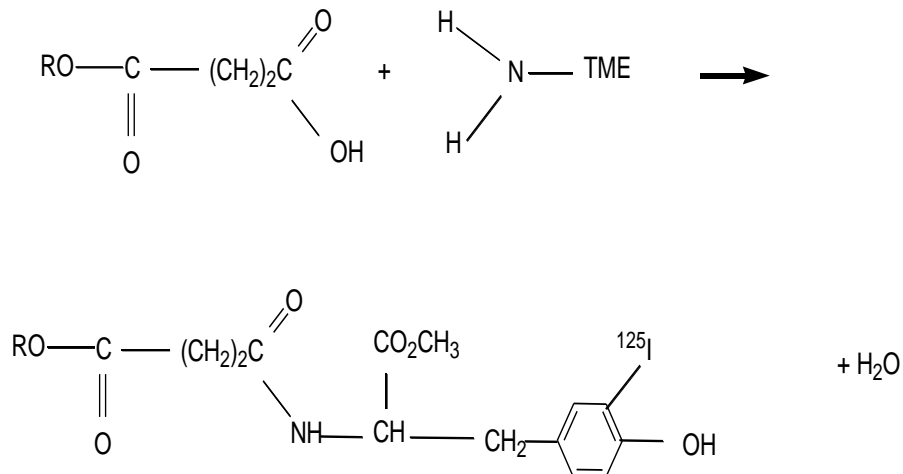


Figure 1.21 : principe de marquage d'une protéine ou haptène par le TME [110]

Exemple 2 : cas du réactif de Bolton et Hunter, 1973, **SHPP** (Succinimidyl-3-(4-hydroxy,5-¹²⁵I-iodophenyl)propionate)(**Figure 1.22**)

Dans le commerce (Thermo Fisher), il existe sous deux formes, l'une non soluble dans l'eau (N-SHPP) et l'autre soluble dans l'eau (Sulfo-SHPP).

Il permet le radiomarquage des peptides dépourvus de groupement tyrosine par l'acylation des fonctions amines primaires (-NH₂) de la molécule avec l'ester N-hydroxysuccinimidique du réactif marqué à l'iode 125 (**Figure 1.23**). Il existe au niveau de la protéine deux types de groupements pouvant réagir :

- le groupement aminé terminal des peptides (position α)
- le groupement aminé primaire de la lysine (position ε), qui est dotée d'une réactivité supérieure à la première.

Aussi, il a été mis au point un autre réactif comparable au SHPP qui est le N-succinimidyl-para-iodobenzoate et le N-succinimidyl-méta-iodobenzoate, dont le rendement de marquage est deux fois meilleur [126].

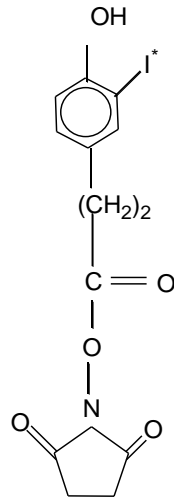


Figure 1.22 : Réactif de *Bolton et Hunter*, 1973

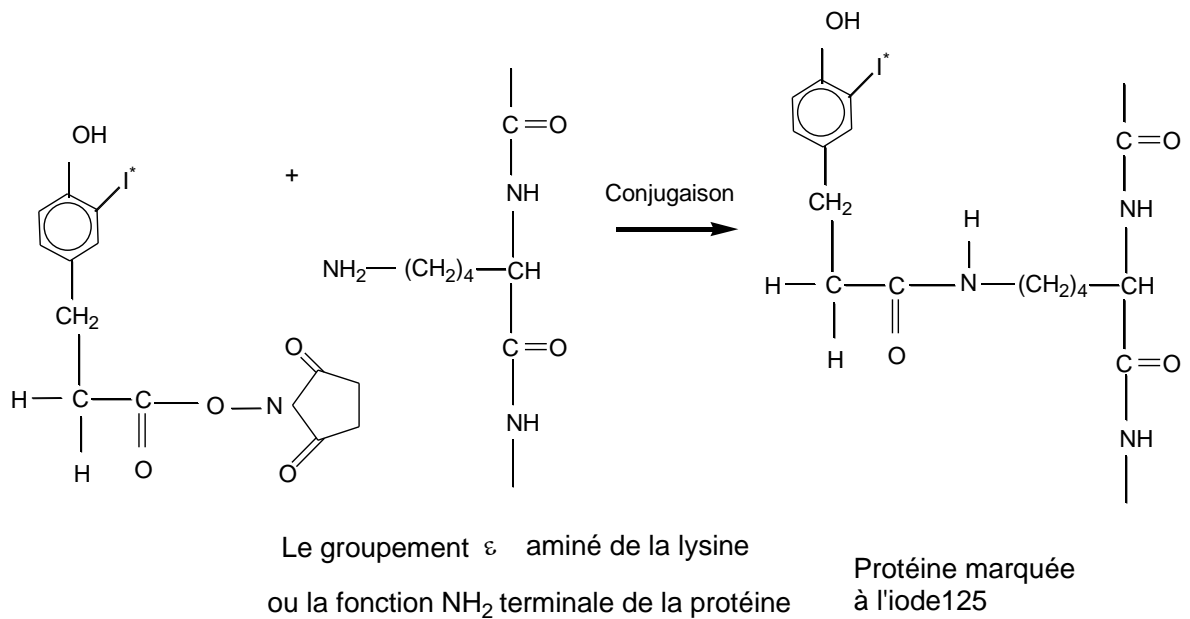


Figure 1.23 : Principe de marquage d'une protéine par le réactif de Bolton et Hunter [110].

Exemple 3 : Le ligand iodohistamine

Ce réactif peut être acheté ou synthétisé au laboratoire [122, 127, 128, 129]. Le radiomarquage de ce bras à ^{125}I se fait par oxydation de l'histamine à la chloramine T (procédure de Hunter-Greenwood, 1962 [117]) à de faible concentration, pendant une durée qui varie de 30s à 2mn [119,130]. Le pH optimum d'iodination de l'histamine est 8.0, il favorise l'obtention du traceur mono-iodohistamine par rapport au di-iodo et tri-iodohistamine [131].

Contrairement au réactif Bolton-Hunter, le complexe iodohistamine ne subit aucune activation lors de sa conjugaison, c'est le groupement carboxyle (COOH) de la protéine à marquer qui est préalablement activée au moyen d'anhydride mixte en interagissant avec l'isobutylchloroformate, pour être ensuite couplée à la fonction amine (NH_2) du résidu iodohistamine (**Figure 1.24**).

Cette méthode est préconisée pour le marquage des haptènes, contrairement aux protéines, à cause de la nécessité d'utilisation d'un solvant organique lors de la formation d'anhydride mixte. Son désavantage est qu'elle engendre trop de sous-produits de marquage, d'où la nécessité d'une méthode de purification efficace.

Si la molécule à marquer ne dispose pas d'un groupement carboxyle (COOH), une première étape consiste à lui en fixer un à partir de l'acide succinique

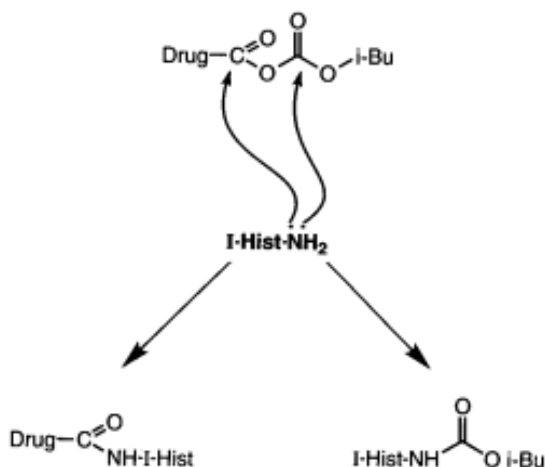


Figure 1.24 : conjugaison de l'iodohistamine (^{125}I -histamine- NH_2) aux dérivées d'anhydride mixte de la molécule à marquer et formation d'un traceur et de sous-produits de marquage [119]

d) Purification du produit radiomarqué :

Après le marquage de protéines, peptides ou haptènes, il résulte dans le milieu réactionnel une mixture de fractions dont le substrat marqué, les produits de dégradation ou agrégats marqués ou non et l'iodure I^{125} qui n'a pas réagi. La purification a pour objectif de séparer le substrat marqué des autres fractions, ce qui a pour conséquence l'amélioration de l'activité spécifique et l'immunoréactivité du traceur obtenu.

La purification des molécules marquées à l'iode peut être réalisée par de nombreuses techniques [114, 116]. Il s'agit :

- de la chromatographie liquide haute performance : HPLC (High Performance Liquid-Chromatography) ;
- de la chromatographie sur couche mince CCM ;
- de la dialyse ;
- de la chromatographie par échange d'ions (amberlites, dowex...) ;
- de l'électrophorèse sur gel d'amidon ou d'acrylamide ;
- de la chromatographie de perméation sur gel (Sephadex® de Pharmacia, Biogel® de Biorad).

e) Paramètres de caractérisation du traceur radiomarqué :

Après la préparation et la purification de la molécule marquée, la qualité de celui-ci est estimée qualitativement et quantitativement à travers le contrôle de plusieurs paramètres [110, 114], dont :

i. Rendement de marquage :

Le rendement de marquage R (%) constitue une estimation quantitative du traceur. Il permet d'apprécier la qualité du marquage et de calculer l'activité spécifique du traceur. Il est déterminé par le rapport de l'activité totale du produit iodé récupérée après purification à l'activité totale utilisée lors du marquage. Le rendement de marquage ne doit pas être inférieur à 40 % [110].

ii. Activité spécifique :

L'activité spécifique de la molécule radiomarquée est exprimée en unité de radioactivité du traceur par unité de masse de la molécule radiomarquée ($\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$).

iii. Activité volumique :

L'activité volumique du traceur est exprimée en en unité de radioactivité par unité de volume du traceur ($\mu\text{Ci} / \text{ml}$).

iv. Pureté radiochimique :

Elle est estimée par électrophorèse sur papier Whatman. Le principe de cette méthode est basé sur la migration des particules chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique, cette migration dépend de la charge et de la taille de la molécule radiomarquée.

La chromatographie sur couche mince (CCM) peut aussi être employée, en raison de sa simplicité et des faibles volumes de dépôts en complexe radiomarqué.

vii. Contrôle de l'immunoréactivité :

L'immunoréactivité du traceur constitue un critère qualitatif. Elle est évaluée par la détermination du pourcentage de liaisons spécifique maximum (B0/T) ou Bmax, en présence de son anticorps spécifique en excès et du pourcentage de liaisons non spécifiques (LNS) en absence de l'anticorps (B/T).

f) Stabilité et conservation du traceur :

Les phénomènes de radiolyse sont responsables de la dégradation dans le temps des molécules marquées. Pour cela, il est important d'évaluer la pureté radiochimique et l'immunoréactivité du traceur préparé dans le temps, en fonction du mode de conservation et du milieu de dilution choisi.

1.4.2.2. Techniques de séparation des formes libres et liées :

Depuis l'avènement du radioimmunodosage, différentes procédures de séparation des formes libres et liées, permettant de mesurer l'activité de l'une ou de l'autre des fractions ont été développées. De la méthode par chromato-électrophorèse développée par Yalow et Berson en 1958, à la technique de phase solide « coated tubes » introduite par Catt, Niall et Tregear en 1966, toutes les techniques mises au point ont fait l'objet d'études et ont été décrites par la littérature [118,133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140].

De manière générale, Une bonne méthode de séparation doit répondre à certains critères essentiels qui sont :

1. permettre une séparation aussi complète que possible (>95%) entre les deux fractions libre et liée ;
2. doit être simple, rapide et reproductible ;
3. ne doit pas affecter l'équilibre atteint, entraînant une perte de sensibilité et de précision ;
4. doit être peu coûteuse.

Parmi les systèmes de séparation proposés, certains restent encore très sollicités :

- *système de séparation chimique par précipitation au polyéthylène glycol (PEG 6000) ou par adsorption au Charbon actif-Dextran, suivi d'une centrifugation (Figure 1.25).*

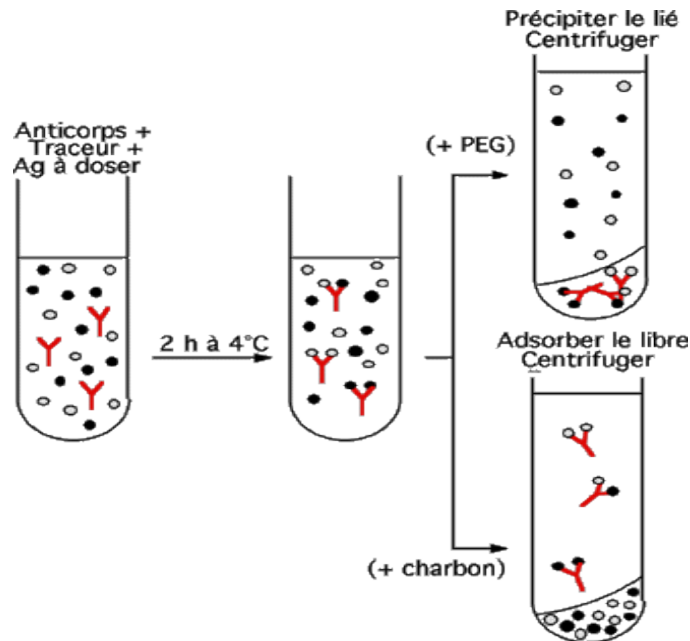


Figure 1.25 : Méthodes de séparation chimiques [109]

- *système de séparation par immunoprécipitation dite à double anticorps. Un second anticorps anti-immunoglobuline Ac1 (Ac2), fixe le complexe Ac1-Ag* (Figure 1.26), l'ensemble est précipité par centrifugation ou par filtration sur des membranes d'acétate de cellulose [140].*

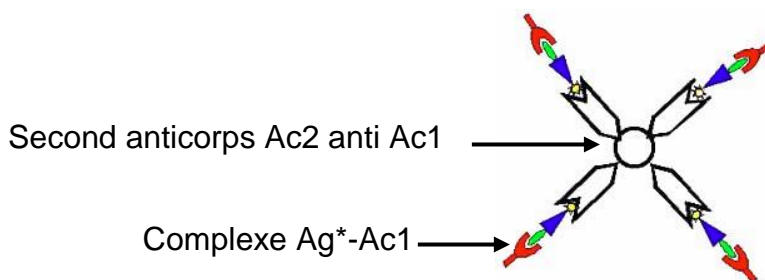


Figure 1.26 : Méthode de séparation par immunoprécipitation[142]

- *système de séparation par fixation des Ac sur des matrices solides dit « phase solide » (Figure 1.27) :*

Cette technique basée sur l'insolubilité des anticorps et la rapidité d'adsorption irréversible de ces derniers aux parois des matrices solides a révolutionné le domaine de l'immunoséparation [143]. La séparation par usage de la phase solide a contribué de par sa simplicité et sa rapidité à l'automatisation du radioimmunoséparation. Depuis son introduction en 1966, divers supports solides ont été utilisés pour l'immobilisation des anticorps, nous citons les particules solides telles que la cellulose, le Sephadex activé, les billes d'agarose, les particules magnétiques et les surfaces solides, tels que les tubes, les disques, les microplaques ou les balles en polystyrène. Quant aux processus d'immobilisation des anticorps sur les phases solides, trois types ont été rapportés par la littérature [144, 145, 146, 147]. Nous retrouvons l'immobilisation par adsorption physique à une surface hydrophobe, l'immobilisation par liaison covalente à une surface dont les groupes sont préalablement activés et enfin, par couplage grâce à des liaisons de type non covalente (électrostatiques et hydrophiles) à une molécule (streptavidine, biotine, protéine A ou G), déjà immobilisée à la surface solide par les deux premières méthodes d'immobilisation préalablement indiquées.

Concernant les conditions d'immobilisation, Porstmann et Kiessig, 1992 rapportent qu'un pH de 7 à 9.5 du tampon de dissolution des IgG, n'affecte relativement pas leur adsorption aux supports solides et la température d'incubation pendant l'immobilisation a peu d'effet sur l'adsorption des IgG [139]. De plus, ces derniers doivent être très purs et leur concentration lors d'une adsorption pour une phase solide ne doit pas dépasser 10µg/ml.

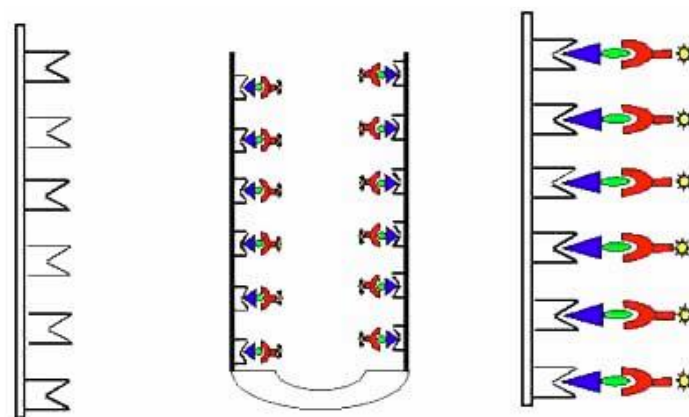


Figure 1.27 : Méthode de séparation par fixation d'Ac sur un support solide [142]

1.4.2.3. Préparation et calibration d'une gamme d'étalons :

L'interférence en immunodosage est définie comme étant l'effet de substance présente dans l'échantillon susceptible d'affecter l'obtention de la valeur correcte du résultat [148]. Parmi les interférences rencontrées lors du dosage immunologique, en plus de celles liées à l'anticorps (défauts de spécificité) et celles liées aux protéines de transport, nous avons l'effet matrice [147, 148, 149].

En effet, la réaction anticorps-antigène est régie par un certain nombre de paramètres du milieu réactionnel (pH, force ionique et concentration en protéines), qui dépendent du liquide biologique [148, 152, 153]. A ce titre, l'immunodosage des stéroïdes présente des difficultés liées aux caractéristiques physicochimiques de ces molécules, à leur métabolisme et surtout aux effets matriciels engendrés par les acides gras et les protéines de liaison [154]. Pour toutes ces raisons, l'étalon doit présenter une structure identique ou la plus proche possible de la molécule à doser, il doit être préparé dans un milieu (matrice) identique à celui de l'échantillon à doser, afin de conserver son activité immunologique. Il doit être stable, aussi bien lors de sa préparation que sa conservation, il doit être homogène d'un flacon à l'autre et il doit être préparé en quantité suffisante [155].

La dégradation de l'étalon peut être engendrée soit par une contamination aux enzymes et/ou des bactéries, soit par un agent d'oxydation, soit par une adsorption sur les parois ou par la température. Afin d'assurer la stabilité de l'étalon, il est important d'ajouter à la solution de dilution de ce dernier une protéine pour éviter son adsorption, un agent bactériologique et des anti-protéases pour inhiber l'action des bactéries et des enzymes et enfin veiller à bien conserver cet étalon en aliquotes, sous la forme lyophilisée de préférence, scellé et stocké à basses températures (< 4°C).

Les étalons une fois préparés doivent subir une calibration par rapport à une trousse commerciale validée dans une matrice identique (étalon secondaire).

1.4.3 Validation d'une trousse radioimmunologique :

Le terme validation selon la littérature fait référence à une vérification ou une caractérisation [156]. Pour le choix d'une technique d'analyse, il s'agit de l'étude de certains critères qui quantifient les performances des méthodes utilisées [157] et prouver que le protocole adopté donne des résultats suffisamment exactes et fiables [158].

Cette validation doit se faire à deux niveaux, le premier est sur le plan technique (efficacité analytique), son but est la vérification du matériel biologique et instrumental utilisé, le second est sur le plan clinique (efficacité diagnostique), le biologiste doit vérifier le pouvoir analysant de la technique utilisée.

1.4.3.1 Evaluation analytique de la trousse :

a) La limite de détection :

La limite de détection d'une technique est la plus petite concentration dont la mesure donne un signal significativement différent du blanc (standard zéro) avec un intervalle de confiance de 95%. Cette notion est différente de la notion sensibilité, qui s'intéresse à toutes les concentrations différentes de zéro et signifie qu'une faible variation de la concentration provoque une variation élevée de signale. La limite de détection se détermine par la répétabilité intra-essai du standard zéro (matrice dépourvue de l'analyte) [110, 159,160].

b) Le test de précision :

La précision par définition est la qualité de l'accord, dans une zone définie de concentration, entre des mesures répétées, effectuées dans des conditions déterminées [110]. Ce contrôle est réalisé à partir de la reproductibilité **intraessais** et **intéressais** du dosage d'échantillons à plusieurs niveaux de concentrations (faible, moyen et fort) et il est exprimé en déterminant la moyenne (M), l'écart-type (S) et le coefficient de variation (CV%) des résultats obtenus. La mesure est d'autant plus précise que l'écart-type et le CV sont faibles (CV < à 10%). Elle permet de détecter les erreurs aléatoires.

c) Le test d'exactitude :

Une technique de dosage est d'autant plus exacte que la moyenne obtenue après une série de mesures d'un même échantillon, permet de donner des résultats plus proches de la valeur vraie, dans la mesure où cette dernière peut être déterminée par une méthode de référence. Dans le cas contraire, on peut vérifier que la technique évaluée est apte à estimer au mieux la valeur de l'analyte mesuré par des tests de dilution et de surcharge. Ce test permet de mettre en évidence l'existence d'une erreur systématique.

- **Test de dilution** : ou test de linéarité ou de parallélisme, il permet d'apprécier que l'estimation de la concentration de l'analyte ayant subi des dilutions en cascade, par la méthode considérée est proportionnelle à la valeur attendue. Dans le cas où la méthode est exacte, le graphe représentant la valeur estimée en fonction de la dilution est une droite linéaire passant par l'origine, d'équation $y=ax$, a étant la pente, égale à la concentration initiale.

- **Test de surcharge** : il permet de vérifier que l'analyte est dosé en totalité dans le milieu réactionnel biologique (sérum ou autre) et cela quel que soit la quantité connue et croissante de la substance à doser ajoutée à l'échantillon de sérum. On parle de l'étroitesse d'accord entre la valeur dosée et la valeur attendue. Ce test permet d'évaluer la perturbation provoquée de certaines espèces physico-chimiques se trouvant dans le sérum sur le signal donné par l'analyte à doser (effet matrice).

1.4.3.2 Evaluation clinique de la trousse :

L'évaluation clinique de la trousse consiste à comparer les valeurs des concentrations de l'analyte, obtenues lors du dosage d'un lot d'échantillons par une trousse RIA commerciale et la trousse RIA développée. Il s'agit de vérifier la cohérence et la concordance des résultats obtenus lors du dosage avec les états physiologiques ou les pathologies cliniques diagnostiquées chez l'espèce prélevée. Cette étape est importante, car elle détermine le diagnostic et le traitement qui en résulte.

CHAPITRE 2

TECHNIQUES D'ETUDE ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

CHAPITRE 2 : TECHNIQUES D'ETUDE ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

Le développement d'une trousse de Radioimmunos dosage (RIA) de la progestérone qui répond aux exigences des utilisateurs, implique dans une première étape, la préparation et la caractérisation des trois réactifs de base.

Le traceur, qui requière le choix de l'antigène à marquer, du type et de la procédure de marquage et des procédures de purification et de caractérisation des réactifs, afin d'obtenir un traceur de qualité. **La phase solide**, qui nécessite le choix d'un anticorps spécifique, à la fois au conjugué radiomarqué et à la progestérone, son titre et le système de séparation des fractions liée et libre performant. **Les étalons de progestérone**, qui doivent être préparés dans une matrice vierge identique à l'échantillon. La seconde étape consiste à fixer et optimiser un protocole de dosage et adapter celui-ci à la matrice et aux conditions pratiques d'utilisation. Au terme de cette optimisation, on termine par l'étape de validation intralaboratoire de la trousse, à travers des essais analytiques et cliniques.

Le déroulement de tous ces travaux a eu lieu au Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND), à l'exception de la partie immunisation des lapins, qui s'est déroulée au niveau de l'Institut Pasteur de Kouba.

2.1 PREPARATION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DU TRACEUR 11 α HYDROXY-PROGESTERONE-HEMISUCCINATE-IODOHISTAMINE :

2.1.1 Réactifs :

La progestérone 11 α hemisuccinate a été acheté chez US Biological (Salem, MA, USA), l'Iode est acheté sous forme de Na I¹²⁵ fourni par Best Medical (Belgique). La progestérone antisérum anti progestérone 11 α Hémisuccinate a été achetée auprès AbDserotec (UK supplied). L'histamine, isobutyle chloroformate, la chloramine-T, le sodium-métabisulfite sont fournis par Sigma Aldrich (Allemagne). 4 -Methylmorpholine est fourni par Fluka (France). Les autres réactifs utilisés dans cette étude étaient de qualité analytique et ont été obtenus auprès de Fluka et Sigma Aldrich. La préparation du tampon phosphate est en annexe 1.

2.1.2 Procédé de marquage indirect à l'iode-125 de la 11 α hydroxy-progestérone-hemisuccinate :

2.1.2.1 Marquage de l'histamine par le NaI¹²⁵ :

a) Procédure de marquage :

Le marquage de l'histamine à l'I¹²⁵ est réalisé selon la méthode directe de Hunter-Greenwood [117] (**Figure 2.1**). 10 μ l d'histamine (2,2 μ g) dans une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,4) est mélangé avec 10 μ l (500 μ Ci) de NaI¹²⁵ dans un petit tube en verre conique. Au mélange, sont ajoutés 10 μ l de chloramine -T (50 μ g) dans 0,1 M de tampon de pH 7,4 phosphate. Après une agitation légère pendant 3 min à 4 °C, la réaction est stoppée par addition de 10 μ l de sodium métabisulfite de (300 μ g) dans 0,1 M de tampon phosphate pH 7,4. Le mélange obtenu est stocké à - 6 °C.

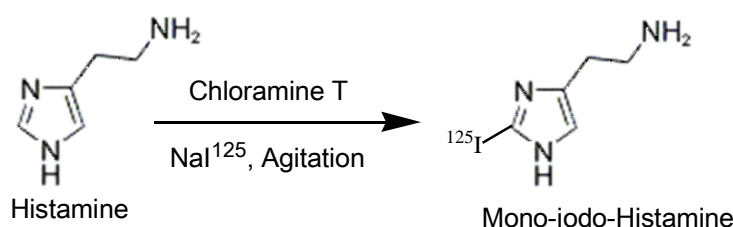


Figure 2.1: Schéma de la réaction de marquage

b) Détermination du rendement de marquage :

La détermination de rendement de marquage est une étape essentielle après chaque marquage, il indique la portion de la radioactivité totale incorporé dans la molécule. Le rendement de marquage est déterminé par électrophorèse sur papier Whatman selon la méthode décrite par Yallow et Berson [108] et Ekins, [132]. Le principe de cette méthode est basé sur la migration des particules chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique, cette migration dépend de la charge et de la taille de la molécule.

Deux bandelettes (33cm /2cm) de papier Whatman N°1 sont placées dans un système électrophorétique de sorte que les 2 extrémités de papier baignent dans un tampon phosphate 0,02 M pendant 15 minutes à 300 V. Après, un volume de 5 μ l d'iodure de potassium (KI) est déposé sur chaque papier du côté du pôle négatif ainsi que 5 μ l de l'histamine-I¹²⁵, l'ensemble est mis sous un courant électrique (300V) pendant une (01) heure. Une fois la migration est terminée, les deux bandes de papier sont séchées, puis découpées en 20 bandelettes de 1cm et déposées dans des tubes numérotés pour mesurer la radioactivité à l'aide d'un compteur gamma à scintillation de type NaI (TI) (Perkin Elmer, Finlande).

Le radiochromatogramme obtenu représente le nombre de CPM en fonction de chaque fraction (bandelettes), le rendement de marquage du complexe iodo-125 histamine est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{Activité en cpm du complexe 125-iodo-histamine} \times 100}{\text{Activité totale en cpm (complexe 125-iodo-histamine + iode 125 libre)}}$$

2.1.2.2 Activation du conjugué 11 α hydroxy-progestérone-hemisuccinate :

Dans un petit tube en verre conique, une solution de 11 α - progestérone hémisuccinate (125 μ g / 50 μ l dans du dioxane sec) refroidie à 10 °C est activée avec 10 μ l d'isobutyle chloroformate (1% dans du dioxane anhydre) et 10 μ l de N-N 4-méthylmorpholine (2% dans du dioxane sec). Le mélange est maintenu à 8-10 °C pendant 45 min, avec des agitations de temps à autres. A la fin de l'incubation, la réaction est arrêtée par addition de 200 μ l de dioxane sec et froid. Il ya formation d'anhydrides mixtes et de l'acide chlorhydrique (**Figures 2.2 et 2.3**).

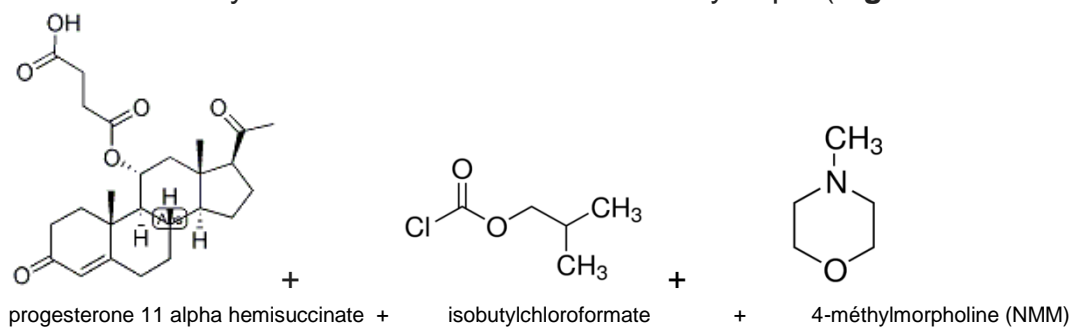
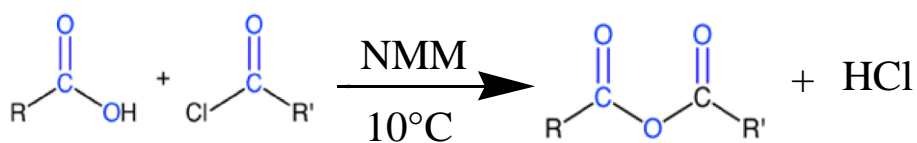


Figure 2.2 : Réactifs d'activation de la progestérone 11 α -HS



R' = O-CH₂-CH-(CH₃)₂
 R = CH₂-CH₂-CO-O-C₂₁-H₂₉O₂

Figure 2.3 : Réaction d'activation et formation d'anhydrides mixtes

2.1.4 Purification du traceur 11 α hydroxy-progestérone-hemisuccinate-¹²⁵Iodohistamine :

La contenu de la fraction 2, qui comprend le traceur 11- α -hydroxyprogéstérone hemisuccinate ¹²⁵Iodo-histamine est purifié par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephadex G-25, afin d'éliminer les contaminants tels que I¹²⁵libre, histamine marquée, et autres produits de d'activation. Cette étape nécessite une préparation préalable du gel et de la colonne chromatographique.

Avant d'être coulé dans la colonne (33 cm x1, 5cm), le gel Sephadex G-25 est mis à gonfler dans le tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 puis il est filtré et dégazé. Après tassement du gel, la colonne est lavée plusieurs fois avec le tampon phosphate (0,05M, pH 7,4) puis équilibrée avec un tampon d'éluion (voir annexe 1). Au sommet de la colonne de purification préalablement préparée et installée, le contenu d'extraction séché, obtenu durant l'étape 2.1.2.4, est reconstitué dans 200 μ l du tampon phosphate à 0.1M (pH 7.4), puis déposé soigneusement sur la surface du gel, l'éluion est effectuée avec le tampon d'éluion. Les éluats sont collectés à raison de 800 μ l/tube, dans des tubes disposés dans un collecteur de fractions de type Spectra/Chrom CF-1. La radioactivité de chaque tube est comptée à l'aide d'un compteur gamma à scintillation type NaI (TI) (Perkin Elmer, Finlande), ce qui permet d'établir un profil d'éluion.

Les fractions correspondant aux pics sont réunies dans des flacons en verre identifiés et évaluées d'un point de vue pureté radiochimique (PRC) et l'immunoréactivité (liaisons spécifiques maximum :Bmax et liaisons non spécifiques : LNS). Le traceur (**Figure 2.5**) identifié est stocké en aliquotes à des températures de 10 °C et -6°C.

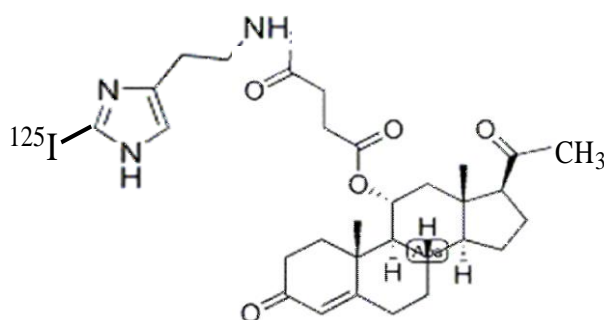


Figure 2.5 : Traceur 11 α hydroxy-progestérone-hemisuccinate-¹²⁵Iodohistamine

2.1.5 Caractérisation du traceur 11- α - hydroxy-progestérone-hemisuccinate-iodohistamine (11- PHS -iodohistamine) :

2.1.5.1 Le rendement de marquage :

Le rendement de marquage du traceur 11- PHS -iodohistamine est déterminé sur la base du profil d'éluion, à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Rdt}(\%) = \frac{\text{activité associée à la molécule} \times 100}{\text{activité totale}}$$

2.1.5.2 Activité spécifique :

L'activité spécifique de la molécule radiomarkée est exprimée en unité de radioactivité par unité de masse ($\mu\text{ci} / \mu\text{g}$). Elle est déterminée sur la base du profil d'éluion, par la formule ci-dessous :

$$\text{AS}(\mu\text{ci} / \mu\text{g}) = \frac{\text{pourcentage de l'incorporation de I125 X radioactivité totale} (\mu\text{ci})}{\text{masse de la molécule} (\mu\text{g})}$$

2.1.5.3 L'activité volumique :

L'activité volumique du traceur a été exprimée en $\mu\text{ci} / \text{ml}$, en prenant en considération l'efficacité du compteur gamma utilisé, qui est de 0.82. Elle est calculée sur la base du profil d'éluion, par la formule suivante :

$$\text{AV} (\mu\text{ci}/\text{ml}) = \frac{\text{activité du traceur en cpm/ml}}{3,7 \times 10000 \times 60 \times \text{Efficacité du compteur}}$$

2.1.5.4 La pureté radiochimique :

La pureté radiochimique du traceur est déterminée par électrophorèse sur papier whatman1, selon la méthode décrite par Yallow et Berson [108] et Ekins, [132]. Le pourcentage de la pureté radiochimique du traceur est calculé par la formule suivante :

$$\text{PRC}(\%) = \frac{\text{activité associée à la molécule} \times 100}{\text{activité totale associée à la molécule et à l'iode libre}}$$

2.1.5.5 L'immunoréactivité :

L'immunoréactivité du traceur est réalisée en double test. Pour l'évaluation de la liaison spécifique maximum (Bmax), sont introduits successivement dans les tubes de type Nunc Maxisorp, revêtus d'anticorps spécifiques à la progestérone 11 α -PHS (système phase solide en excès), 50 μ l du standard sérique zéro progestérone et 250 μ l de traceur (25000 à 35000 cpm), dilué dans un tampon de travail (voir annexe 1). Après mélange, les tubes sont incubés à température ambiante pendant 3 heures sous agitation. Les tubes sont décantés, lavés avec 500 μ l/tube de solution de lavage (voir annexe 1) puis la radioactivité est comptée pendant 1 min dans un compteur gamma (Perkin Elmer). Parallèlement, 250 μ l de traceur de travail (dilué) sont introduit dans un tube ordinaire et comptés afin de déterminer la valeur de l'activité totale (T).

La liaison non spécifique (LNS) du traceur est évaluée en double, par incubation de 250 μ l de traceur de travail dans des tubes de type Nunc Maxisorp non revêtus d'anticorps, saturés et séchés.

L'immunoréactivité du traceur est évaluée par la détermination du pourcentage de liaisons spécifiques maximum (Bo/T) de ce dernier, en présence de son anticorps spécifique. Les liaisons non spécifiques (LNS) sont déterminées en absence de l'anticorps (B/T). Les taux d'immunoréactivité spécifique et le taux de liaisons non spécifiques (LNS), sont calculés par les formules suivantes :

$$\mathbf{Bmax(\%) = \frac{\mathbf{Moyenne\ CPM\ d'essai - Moyenne\ CPM\ des\ LNS}}{\mathbf{Compte\ total\ (cpm)}} \times 100}$$

$$\mathbf{LNS(\%) = \frac{\mathbf{Moyenne\ CPM\ des\ tubes\ LNS}}{\mathbf{Compte\ total\ (cpm)}} \times 100}$$

2.1.5.6 Stabilité du traceur dans le temps :

L'étude de la stabilité du traceur en fonction du temps est évaluée en déterminant des paramètres d'immunoréactivité (Bmax et LNS) et de pureté radiochimique (PRC) selon les mêmes procédures décrites précédemment, pendant une période de 2 mois, à raison d'un contrôle par semaine. Les températures de stockage du traceur stock contrôlées sont 10 C° et -6 C°.

2.2 PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI 11 α HYDROXY-PROGESTERONE-HEMISUCCINATE-BSA :

2.2.1. Réactifs :

Les 11 alphas hydroxyprogestérone-hemisuccinate-BSA est fournie par Interchim (France). L'adjuvant de Freund complet et incomplet est fourni par Sigma. Le chlorure de sodium, le sulfate de sodium sont fournis par Fluka. Le traceur progestérone 11 α HS-¹²⁵Iodohistamine est préparé localement. La 11 α hydroxyprogestérone-HS (80-IP45-25mg) est fournie par Fitzgerald Ind, la 5 α pregnane-3,20-dione (AK140023-1g) est fournie par Ark Pharm, Progestérone de pureté 99% (P0130, MW : 314,47) et la 11-Deoxycorticosterone (D-105-1ml) sont fournis par Sigma. Le polyéthylène-glycol(PEG), la bovine gamma globuline (BYG) et les autres réactifs utilisés dans cette étude sont de grade analytique et ont été achetés chez Fluka et Sigma Aldrich.

2.2.2. Dispositif expérimental et protocole d'immunisation des lapins :

2.2.2.1 Animaux et lieu expérimental :

L'immunisation a été réalisée au niveau de l'animalerie de l'Institut Pasteur (Kouba). L'expérimentation a porté sur deux lapins (A et B) de race New zealand de sexe male, de poids moyen de 2.5- 3 kg.

Les lapins sont hébergés dans des cages spécifiques individuelles, pendant une période d'adaptation d'une (01) semaine et durant toute l'expérimentation. Une alimentation spéciale lapins et de l'eau sont distribuées, par le technicien de l'animalerie. Les cages et les locaux sont nettoyés quotidiennement.

2.2.2.2 Protocole d'immunisation des lapins :

Le protocole d'immunisation adopté est celui décrit par Thorell & Larson [151]. Les lapins sont immunisés par l'immunogène progestérone 11 alpha hemisuccinate-BSA, à raison de 1mg d'immunogène par lapin (1mg/lapin) lors de la première injection intradermique, en plusieurs sites (4x0.25ml), sur une zone du dos, préalablement rasée et aseptisée.

L'immunogène de la première injection est une émulsion obtenue en mélangeant la dose d'immunogène dilué dans 0.5ml NaCl et 0.5ml d'adjuvant de Freund complet, à l'aide de seringues en verre (**Figure 2.6**).



Figure 2.6 : injection intradermique de l'immunogène

Les rappels sont effectués en intramusculaire en une seule injection à raison de 250 μ g d'immunogène/lapin. La préparation de l'émulsion est réalisée en mélangeant la dose d'immunogène dilué dans 250 μ l de NaCl et 250 μ l d'adjuvant de Freund incomplet.

La fréquence des rappels est d'une fois/semaine, pendant le premiers mois d'immunisation et d'une fois/mois pendant les huit mois (08) d'expérimentation.

2.2.2.3 fréquences des prélèvements :

Après un mois d'immunisation, les lapins sont prélevés 10 à 15 jours après chaque rappel. Ces prélèvements sont collectés à partir de la veine marginale de l'oreille, après préparation aseptique de la zone (enlever les poils et nettoyage), à l'aide d'une aiguille. Le volume de sang collecté est de 2 à 3ml/lapin (**Figure 2.7**).



Figure 2.7 : prélèvement de sang au niveau de la veine marginale de l'oreille du lapin.

Une saignée finale est réalisée sur les lapins 10 jours après le dernier rappel pour collecter le maximum d'antisérum. Le volume d'antisérum collecté est d'environ 20ml/lapin.

Les sérums récupérés des prélèvements de sang sont identifiés, congelés puis acheminés au laboratoire du CRND pour évaluer le niveau de réponse immunitaire (détermination du titre) et de l'affinité et de la spécificité.

2.2.2.4 Récupération de l'antisérum :

Le sang des différents prélèvements et celui de la saignée finale est récupéré dans des tubes secs, puis laissé à température ambiante pendant 2 heures environ pour la formation du caillot. Les tubes de sang sont centrifugés (centrifugeuse réfrigérée modèle Jouan CR312), pendant 15 minutes à 4000 tours/mn, à 4°C. Les sérums contenant les anticorps polyclonaux (surnageant) sont récupérés dans des flacons propres, identifiés et sont stockés à -20°C.

2.2.3 Purification des antisérums de la saignée finale :

La fraction globuline des antisérums de la saignée finale est obtenue après précipitation au sulfate de sodium à 25% (V/V), puis à 18%, suivie à chaque fois d'une centrifugation pendant 20 mn (4000 tours/mn, 4°C). Le précipité obtenu dissous dans un tampon phosphate à 0.01M, pH 7.4 est dialysé toute une nuit dans un boudin (Spectra/Por Biotech), contre un tampon phosphate 0.01M pH 7.4 (**Figure 2.8**).

Les globulines obtenues après dialyse sont stockées dans un flacon en verre propre, hermétiquement fermé et préalablement pesé, Le produit congelé dans de l'azote liquide est lyophilisé (lyophilisateur de type CHRIST ALPHA 1-2) pendant 24 heures. Les IgG lyophilisés sont pesés, étiquetés puis conservés au congélateur pour une utilisation lors d'un dosage RIA solide.

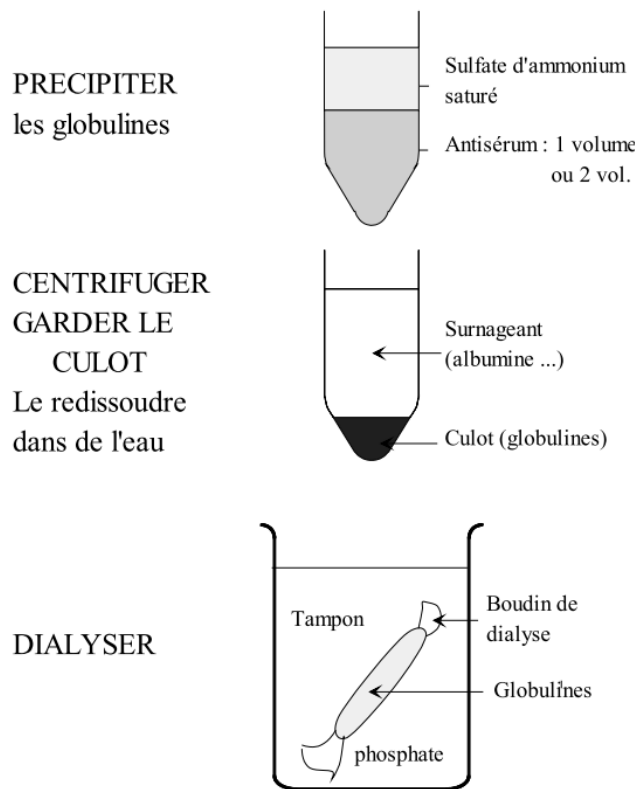


Figure 2.8 : Technique de purification des immunoglobulines : précipitation par les sels (Graud et Roussel, 2007) [162]

2.2.4. Caractérisation des anticorps :

2.2.4.1 Détermination du titre des antisérums :

Le titre des antisérums d'un même animal est défini comme l'inverse de la dilution requise pour lier 50% d'une masse donnée d'hormone marquée à l'iode 125 (RIA) ou un autre marqueur non isotopique (EIA).

Le titre des antisérums collectés et préparés, des lapins A et B est évalué par un dosage radioimmunologique (RIA) liquide, selon le protocole présenté dans le **tableau 2.1a**.

Tableau 2.1a : Protocole d'évaluation du titre des antisérums par le système de séparation PEG/ bovine γ globuline

Tubes	Dilutions de l'antisérum	Traceur		Mesurer la radioactivité totale ensuite		
Bmax	Pour chaque dilution d'Ac, introduire 100 μ l d'antisérum /tube + 50 μ l de tampon de travail	200 μ l	Agitation rotative 3h.	Ajouter dans chaque tube :	Centrifuger pendant 15 minutes à 3500 tours /min à 4°C	Après élimination du surnageant, mesurer la radioactivité du précipité/ tube à l'aide d'un compteur gamma (1mn)
LNS	(Absence d'Ac) introduire 100 μ l de tampon de travail/tube	200 μ l		700 μ l de PEG et 100 μ l de B γ globuline		

(TC) ou compte total : Ajouter 200 μ l de traceur dans deux tubes ordinaires pour obtenir les CPM totaux.

Les antisérums recueillis par animal ont été dilués de 1/10 à 1/10000. Chaque série de dilution d'anticorps produit est incubée en présence d'un volume constant de l'hormone correspondante marquée à l'iode 125. Après incubation du mélange réactionnel, les formes liées (complexe anticorps- antigène) sont séparées des formes libres par précipitation au Polyéthylène Glycol (PEG) à 25%, en présence du bovin gamma globuline (BYG) à 15mg/ml et par centrifugation. La radioactivité des précipités obtenus est mesurée sur le compteur gamma de type Perkin Elmer.

Le titre est déterminé à partir de la courbe représentant les pourcentages de (**Bo/Tc**) en fonction des dilutions de l'antisérum considéré.

Ou : **B** représente la fraction d'antigène marqué liée à l'anticorps (Ag*-Ac) et **Tc** la fraction totale de l'antigène marqué incorporée dans le tube de dosage.

Le Polyéthylène-glycol (PEG) et la bovine γ globuline sont utilisés afin de favoriser la précipitation de la fraction liée (voir annexe 1). La préparation des différentes dilutions d'anticorps est effectuée dans le tampon de travail (voir annexe 1).

Les résultats obtenus sont exprimés en CPM avant et après séparation, permettant de calculer le pourcentage de liaisons maximum spécifiques (% Bmax) et de liaisons non spécifiques (% LNS) selon les formules présentées au paragraphe "immunoréactivité". Chaque essai est réalisé en double.

2.2.4.2 Détermination de la spécificité de l'antisérum :

La spécificité d'un anticorps (Ac) pour son antigène (Ag) est sa capacité à reconnaître et à réagir seulement avec cet antigène spécifique. Elle est mesurée par le pourcentage de réactions croisées, évalué par les rapports (%), des concentrations de l'antigène étudié et de la molécule interférente produisant chacune un déplacement de 50% du traceur (Ag*) lié à l'Anticorps.

Elle consiste à réaliser des courbes d'étalonnage par dosage radioimmunologique de compétition, en présence de quantités fixes de traceur (Ag*) et d'anticorps (Ac) à tester et de quantités croissantes de la substance susceptible d'interférer (molécules de structure analogue). Il s'agit de remplacer la gamme d'étalonnage originale (progestérone) par des quantités croissantes (gamme d'étalons) de la substance interférente.

Pour cette détermination, l'antisérum est dilué à la concentration correspondant au titre et le dosage est réalisé par RIA liquide selon la procédure décrite précédemment (**Tableau 2.1a**).

Les stéroïdes testés pour la détermination de la spécificité des antisérums sont la progestérone 11 α hémisuccinate, la 5 α pregnane-3,20-dione et la 11-Deoxycorticosterone.

Le calcul du pourcentage de réactions croisées (%RC) est fait par le test classique à 50% de compétition décrit par Abraham (indice d'Abraham I ou RC₅₀). Il s'agit du rapport des concentrations de substance nécessaires pour abaisser de moitié la fraction totale B/Tc [110].

$$\% Rc = \frac{\text{Concentration en Ag à 50\% de liaisons.}}{\text{Concentration en analogue correspondant à 50\% de liaisons}} \times 100$$

2.3 PREPARATION ET STABILITE DE LA PHASE SOLIDE :

2.3.1 Réactifs :

L'antisérum anti progestérone 11 α Hémissuccinate utilisée lors de la préparation de la phase solide de la trousse développée et de la comparaison aux systèmes de séparation phase liquide, est achetée auprès AbDserotec (UKsupplied). Le traceur progestérone 11 α HS-iodohistamine est préparé localement. Le tampon de fixation est un tampon carbonate (0.05M/ pH 9.6). Le tampon de saturation est un tampon phosphate (0.05M/ pH 7.4), enrichie de gélatine et de sucrose. Le polyéthylène-glycol(PEG), la bovine gamma globuline (BYG), le charbon actif et les réactifs utilisés pour la préparation des tampons (voir annexe 1) et autres réactifs sont de grade analytique et ont été achetés chez Fluka et Sigma Aldrich. Les tubes de fixation sont en polystyrène « haute adsorption » de type Nunc Maxisorp.

2.3.2 Procédé de fixation des anticorps sur des tubes (coating) :

L'anticorps anti-progestérone est préparée à la dilution de 1/300, dans du tampon de fixation carbonate (0.05M, pH 9.6), puis il est distribué à raison de 300 μ l/tube. Les tubes sont incubés pendant 24 heures à la température ambiante. Après cette durée d'incubation, la solution d'anticorps dans les tubes est aspirée et remplacée par le tampon de saturation (0.05M, pH 7.4), à raison de 400 μ l/tube, pendant une durée de 24 heures. Après aspiration de cette solution, les tubes sont stockés à 4 °C près pour une utilisation.

L'étape de saturation permet de saturer tous les sites inoccupés au niveau de la paroi du tube. Elle permet de diminuer au maximum les liaisons non spécifiques.

La fixation est réalisée par adsorption physique des anticorps aux parois des tubes de type Nunc Maxisorp, conçus pour l'immunodosage.

2.3.3 Procédé de préparation des tubes destinés à l'évaluation de la liaison non spécifique :

Les tubes destinés à l'évaluation du pourcentage de liaisons non spécifiques subissent un traitement identique aux tubes coatés, à l'exception de l'étape de fixation, qui est réalisée sans l'ajout de l'anticorps.

2.3.4 Comparaison des performances du système phase solide à celles du système phase liquide (PEG/ bovine γ globuline et Charbon actif-Dextron):

a) Protocole de détermination de l'immunoréactivité par le système de séparation phase solide :

Le protocole adopté pour la détermination de l'immunoréactivité du traceur par le système solide est résumé dans le **tableau 2.1b**.

Tableau 2.1b : Protocole de détermination de l'immunoréactivité avec le système de séparation phase solide.

Etape 1 <i>Répartition</i>	Etape 2 <i>Incubation</i>	Etape 3 <i>Comptage</i>
<p>Dans les tubes recouverts d'anticorps distribuer successivement : 50μl de tampon de travail</p> <p>Et</p> <p>250 μl de traceur de travail (25000 à 35000 CPM), dilué dans un tampon de travail (voir annexe 1)</p>	<p>Incuber 3 heures à 18-25°C avec agitation rotative</p>	<p>Aspirer successivement le contenu de chaque tube à l'exception des tubes total compte (TC). Et</p> <p>Laver chaque tube deux fois avec 500μl de solution de lavage Et</p> <p>Compter la radioactivité de chaque tube (fraction liée) en CPM pendant une (01) minute.</p>

(TC) ou compte total : Ajouter 250 μ l de traceur dans deux tubes ordinaires pour obtenir les CPM totaux.

b) Protocole de détermination de l'immunoréactivité par le système de séparation phase liquide (PEG/ bovine γ globuline) :

Le Polyéthylène-glycol (PEG 6000) et la bovine γ globuline sont préparés séparément, respectivement à 25% et 15mg/ml dans un TP (0.05M, pH7.4). Le protocole adopté pour la détermination de l'immunoréactivité du traceur avec ce système de séparation est résumé par le **tableau 2.1a**.

c) Protocole de détermination de l'immunoréactivité par le système de séparation phase liquide (Charbon /Dextran) :

Pour la préparation de la suspension charbon-dextran, mélanger 250mg de charbon actif et 25 mg de dextran T70 dans 100 ml de tampon de travail puis agiter pendant 30 mn à 1 heure à froid. Cette préparation doit être conservée au réfrigérateur. Le protocole qui est adopté pour la détermination de

l'immunoréactivité du traceur avec le système charbon-dextran est résumé par le **tableau 2.1c** :

Tableau 2.1c : Protocole de détermination de l'immunoréactivité avec le système de séparation Charbon actif/Dextran.

Tubes	Dilutions de l'antisérum	Traceur	Incubation 1	Mesurer la radioactivité Totale/tube ensuite Ajouter	Incubation 2	Centrifuger pendant 15mn à 4°C à 3500 tours /min	Récupérer le Surnageant / tube et mesurer sa radioactivité à l'aide d'un compteur gamma (1mn)
Bmax	Pour chaque dilution d'Ac, introduire 100 µl d'antisérum /tube + 50µl Tampon	200µl	Agitation rotative 3h à 25°C	500µl/tube à froid et sous agitation de charbon-dextran	15min, à 4°C		
LNS	(Absence d'Ac) introduire 100µl de tampon de travail/tube	200µl					

(TC) ou compte total : Ajouter 200µl de traceur dans deux tubes ordinaires pour obtenir les CPM totaux.

2.3.5 Etude de la stabilité de la phase solide :

Une fois préparés, les tubes coatés et non coatés (LNS) d'anticorps ont été stockés hermétiquement au réfrigérateur et ont fait l'objet d'une étude de stabilité. Les taux de liaison spécifiques (%Bmax) et non spécifiques (%LNS) ont été évalués pendant une durée de 24 mois selon le protocole décrit au paragraphe 2.1.5.5. Chaque essai est réalisé en double.

2.4 PREPARATION ET CALIBRATION DE LA GAMME D'ETALONS

PROGESTERONE LAIT :

2.4.1 Réactifs :

Progestérone de pureté 99% (P0130, MW: 314,47) achetée chez Sigma, méthanol, lait de vaches en post-partum, charbon actif, tampon phosphate (0.05 M, pH 7.4) et de l'azide de sodium NaN₃ fourni par Sigma (25g), préparé à 0.1% (voir annexe 1), Trousses radioimmunologiques RIA de dosage de la progestérone sérique/Immunotech (code 1188), achetées chez Beckman Coulter.

2.4.2 Procédé de préparation des étalons :

2.4.2.1 Préparation de la matrice zéro progestérone :

Afin d'extraire toute trace de progestérone, le lait collecté des vaches post-partum est d'abord centrifugé à 3000 tours/mn, à 4°C, pendant 15 mn pour récupérer le lait écrémé, puis il est ensuite traité avec du charbon actif à raison de 50 mg/ml pendant toute la nuit, sous agitation au réfrigérateur. Le lendemain le lait écrémé est filtré sous papier filtre Whatman N°3, puis centrifugé à 4500 tours/mn, à 4°C, pendant 20mn puis filtré successivement sur un filtre 0.45µm, 0.22 µm, pour éliminer toute trace de charbon.

Dans cette étude, trois matrices zéro progestérone ont été préparées et étudiées. Elles sont constituées à 0%, 50% et 100% de lait écrémé traité, mélangé à un tampon phosphate (0.05M, pH7.4) et de l'azide de sodium à 0.1%.

2.4.2.2 Préparation et calibration de solution mère de progestérone :

Le protocole de préparation des solutions de progestérone est présenté comme suit :

Une première solution (S1) de progestérone est préparée à une concentration de 0.2mg/ml, en pesant 5mg de progestérone pur (balance de type Sartorius Basic). Cette quantité est dissoute dans un volume de 25ml d'éthanol. A partir de cette première solution S1, quatre (04) solutions mère à une concentration de 4µg/ml, ont été préparées dans quatre fioles jaugées de 10ml, en prélevant 200µl de la solution S1, puis compléter à 10ml avec du tampon phosphate (TP : 0.05M, pH7.4). Afin d'atténuer le risque d'erreur aléatoire, ces solutions mère à 4µg/ml sont d'abord mélangées et homogénéisées par un agitateur magnétique de type IKA®RH digital KT/C, la solution mère obtenue est calibrée avec un spectrophotomètre UV de type T90+UV/VIS spectrometer PG instruments Ltd relié à un PC doté du logiciel (UV WIN5 LAB).

La densité optique (DO) de la solution mère est mesurée à 248nm et la concentration en progestérone est mesurée selon la loi de Beer-Lambert, exprimée sous la formule :

$$DO = \epsilon c l.$$

ϵ : est le coefficient d'extinction molaire (18000 pour la progestérone [154])

c : est la concentration de la solution en nmol/l

l : est la longueur de la cuve = 1cm

2.4.2.3 Préparation des solutions standards de progestérone :

Le protocole de préparation des solutions standards de progestérone est comme suit :

- Préparer une solution intermédiaire de concentration 1000ng/ml en prélevant un volume de la solution mère et l'ajuster dans une fiole de 10ml avec du TP (**solution intermédiaire 1**).
- Préparer une autre solution intermédiaire de concentration 400ng/ml en prélevant un volume de 4ml de la solution intermédiaire 1 et l'ajuster dans une fiole à un volume de 10ml de TP (**solution intermédiaire 2**).
- Les solutions standards de progestérone de concentrations croissantes (0-0.625-1.25-2.50-10 et 40ng/ml) sont préparées en commençant par le standard 40ng/ml. Les autres standards sont préparés par dilution en cascade dans du tampon phosphate (TP), pour des raisons de calibration (**Tableau 2.2**). Les étalons sont ensuite aliquotés en un volume de 1ml, puis lyophilisés et stockés à 4°C.

Pour le besoin du dosage, ces étalons sont reconstitués soit dans de l'eau distillée pour la matrice tampon phosphate, soit dans une matrice lait écrémé incorporé à 50% ou 100%.

Tableau 2.2 : Dilutions des étalons progestérone dans du Tampon phosphate

Concentration du standard (ng/ml)	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625
Concentration de la solution de progestérone prélevée (ng/ml)	400	40	20	10	5	2.5	1.25
volume de la solution progestérone prélevé (ml)	5	25	25	25	25	25	25
Volume ajouté en TP pour ajuster à 50ml (ml)	45	25	25	25	25	25	25

2.4.3. Calibration des étalons contre un étalon secondaire :

Les étalons de progestérone préparés sont reconstitués dans de l'eau distillée pour restituer la matrice TP. Ils sont ensuite calibrés par un dosage radioimmunologique de la progestérone, utilisant la seule trousse commerciale disponible sur le marché : RIA progestérone Immunotech/sérum humain Beckman Coulter (code 1188). Chaque étalon est dosé 20 fois en intra-dosage,

une valeur moyenne de la concentration est calculée avec un écart type et un coefficient de variation.

Ces mêmes étalons progestérone lyophilisés ont été reconstitués dans les matrices lait écrémé incorporé à 50% et à 100% et ont ensuite fait l'objet d'un dosage radioimmunologique, utilisant toujours la trousse Immunotech/sérum. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec la matrice tampon phosphate.

Le protocole de dosage RIA Immunotech est résumé dans le **tableau 2.3**.

Tableau 2.3 : Mode opératoire du dosage RIA progestérone de la trousse Immunotech sérique

Etape 1 Répartition	Etape 2 Incubation	Etape 3 Comptage
Dans les tubes recouverts d'anticorps, distribuer successivement: - 50 μ L de calibrateur ou d'échantillon et - 500 μ L de traceur* Agiter	Incuber 1 heure à 18-25°C avec agitation (350 rpm)	Aspirer soigneusement le contenu de chaque tube (sauf les 2 tubes «cpm totaux») Compter les cpm liés (B) et cpm totaux (T) pendant 1 min.

* Ajouter 500 μ L de traceur dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux.

2.4.4 Stabilité des étalons dans le temps :

Afin de contrôler la stabilité des concentrations de progestérone des étalons préparés dans du tampon phosphate et conservés par lyophilisation, ces derniers ont été recontrôlés trois (03) années plus tard par un dosage radioimmunologique utilisant la même trousse Immunotech sérique.

2.5 MISE AU POINT DE DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DANS UNE MATRICE LAIT ECREME :

2.5.1 Optimisation du dosage RIA :

Les paramètres retenus dans l'optimisation du dosage radioimmunologique de la progestérone sont ceux susceptibles d'influencer le bon déroulement de la réaction de compétition. Il s'agit de la durée et de la température d'incubation de la réaction d'immunocompétition, le nombre de lavages des tubes de dosage après séparation des fractions libres et liées.

Lors de cette optimisation plusieurs paramètres liés à la courbe d'immuno-compétition ont été évalués. Il s'agit du taux de liaisons maximum, des doses de progestérones aux interceptes 20%, 50% et 80% de B/Bo et de la limite de détection. Cette dernière est déterminée directement par le logiciel RIA (LB2111-12) relié au compteur gamma NaI. Elle exprime la répétabilité intra-essai du standard zéro (0ng/ml) lors d'un dosage RIA progestérone [110, 159,160].

La limite de détection est déterminée en concentration de progestérone sur la courbe d'étalonnage, correspondant au taux de liaisons (%B/Bo), calculé par la formule suivante :

$$B/Bo (\%) = \frac{\text{Moyenne en CPM de Bo} - 3 \text{ écarts - type en CPM}}{\text{Bo en CPM}} \times 100$$

2.5.2 Protocole de dosage radioimmunologique adopté pour la trousse développée :

Pour la réalisation des courbes d'étalonnage, le dosage RIA est effectué avec des solutions étalons progestérone de concentration croissante. Ce dosage permet d'établir une compétition entre le traceur préparé qui représente l'Ag marqué et les solutions étalon qui représentent l'Ag froid vis-à-vis d'un nombre limité d'anticorps. Le protocole adopté pour la réalisation du dosage est celui décrit par le **tableau 2.4**.

Tableau 2.4 : Protocole de dosage radioimmunologique adoptée pour la trousse Développée.

Etape 1 <i>Répartition</i>	Etape 2 <i>Incubation</i>	Etape 3 <i>Comptage</i>
<p>Dans les tubes recouverts d'anticorps à 1/300, distribuer successivement : 50µl de chaque standard reconstitué dans une matrice lait à 50%</p> <p>Et</p> <p>250 µl de traceur de travail (25000 à 35000 CPM), dilué dans un tampon de travail (voir annexe 1)</p>	<p>Incuber 18 heures à 18-25°C avec agitation rotative</p>	<p>Aspirer successivement le contenu de chaque tube à l'exception des tubes total compte (TC). Et</p> <p>Laver chaque tube deux fois avec 500µl de solution de lavage Et</p> <p>Compter la radioactivité de chaque tube (fraction liée) en CPM pendant une (01) minute.</p>

(TC) ou compte total : Ajouter 250µl de traceur dans deux tubes ordinaires pour obtenir les CPM totaux.

2.6 VALIDATION DE LA TROUSSE RIA PROGESTERONE/LAIT DEVELOPPEE :

2.6.1 Réactifs :

Trousses radioimmunologiques de dosage de la progestérone dans le lait bovin développées localement, trousses radioimmunologiques de dosage de la progestérone dans le sérum/ Immunotech (code 1188) achetées chez Beckman Coulter. L'azide de sodium NaN_3 est fourni par Sigma.

2.6.2 Traitement des échantillons de lait :

Les échantillons de lait utilisés pour la validation de la trousse développée, ont été collectés durant la traite de l'après-midi, sur des vaches à différents stades physiologiques, appartenant à des élevages privés de la Mitidja. Les échantillons de lait ont été conservés par addition d'azide de sodium à raison de 5mg/10ml et ensuite traités laboratoire du CRND pour récupérer le lait écrémé (centrifugation à 3000 tours/mn, à 4°C, pendant 15 mn). Ces échantillons de lait écrémé ont été stockés au réfrigérateur jusqu'au jour du dosage.

2.6.3 Évaluation analytique de la trousse RIA progestérone développée

2.6.3.1 Le test de précision :

La précision d'un dosage exprime la reproductibilité en intra-dosage (n=20) et en inter-dosages (n=20), des résultats de dosage de la progestérone par la technique RIA (trousse locale), de trois (03) échantillons de lait écrémé bovins de concentration en progestérone de 0.30, 4.84 et 20.93ng/ml pour l'intra essais et 0.50, 3.28 et 13.39ng/ml pour l'inter essais. Pour chaque échantillon de lait écrémé dosé, sont calculés la moyenne des concentrations obtenues, l'écart-type et le coefficient de variation (%).

2.6.3.2 Le test d'exactitude :

- **Test de dilution** : trois (03) échantillons de lait écrémé bovin de concentration en progestérone élevée (48.85, 7.68 et 4.41ng/ml) sont dilués chacun en cascade, dans un étalon de lait écrémé zéro progestérone (0ng/ml), aux dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. Les concentrations en progestérone des échantillons et des dilutions sont déterminées en deux fois, par dosage RIA (trousse locale). Les valeurs en progestérone mesurées sont comparées aux valeurs attendues et des pourcentages de recouvrements sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Recouvrement}(\%) = \frac{\text{concentration en progestérone mesurée (ng/ml)} \times 100}{\text{concentration en progestérone attendue (ng/ml)}}$$

- **Test de surcharge** : il est réalisé avec quatre (04) échantillons de lait écrémé bovin de concentration en progestérone basse (0.30, 2.46, 4.41 et 4.74ng/ml). Il consiste à surcharger chaque échantillon de lait (200 μ l), en ajoutant séparément un volume équivalent de chaque concentration de standard progestérone reconstitué dans une matrice lait écrémé (0.58, 1.15 et 11.53ng/ml)t. Les échantillons préparés sont dosés deux fois, par RIA (trousse locale). Les valeurs en progestérone mesurées sont comparées aux valeurs attendues et des pourcentages de recouvrements sont calculés selon la formule ci-dessus.

2.6.4 Evaluation clinique de la trousse RIA progestérone développée :

L'évaluation clinique de la trousse RIA progestérone préparée localement est réalisée sur un lot de trente (30) échantillons de lait écrémé, prélevés sur des vaches à différents stades physiologiques. La progestérone est dosée dans ces échantillons simultanément avec la trousse RIA/progestérone lait bovin développée localement et la trousse commerciale RIA/progestérone sérique "Immunotech", adaptée au dosage de la progestérone dans le lait bovin selon le procédé validé par Lupi-Chen et al 1999 [154].

2.7 ANALYSES STATISTIQUES :

Les analyses statistiques classiques des résultats obtenus sont réalisées à travers le calcul des moyennes, des écarts types et des coefficients de variation, la réalisation des régressions linéaires et l'évaluation des coefficients de corrélation. Les logiciels utilisés sont l'Excel Microsoft et Origine Pro 7.5.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le présent projet, nous avons développé une trousse de dosage radioimmunologique de la progestérone dans le lait bovin suivant le principe de la RIA de compétition. Les 3 réactifs de base utilisés lors du dosage ont été développés localement. Le choix du traceur préparé est le conjugué "progestérone 11 α hemisuccinate" marqué par une méthode indirecte, en le greffant à un bras "histamine" préalablement marqué à l'iode¹²⁵ radioactif en position C11 (carbone 11). Quant au choix de l'anticorps utilisé pour la préparation de la phase solide "tubes coatés", c'est un monoclonal commercial, produit avec l'immunogène "progestérone 11 α hemisuccinate-BSA". La fixation est réalisée en tenant compte de l'influence de la concentration en anticorps fixés et de la nature du tampon de fixation. En parallèle, un essai de production d'anticorps polyclonaux a été entrepris. Dans la partie optimisation, nous avons évalué l'influence de différentes conditions expérimentales (température et durée de la réaction, nombre de lavage des tubes après décantation) sur la réaction de compétition (taux de liaisons maximum, limite de détection, l'allure générale de la courbe d'étalonnage), ensuite, le dosage a été validé sur des échantillons biologiques "lait bovin". Les résultats obtenus ont été comparés avec un dosage RIA de référence (dosage RIA immunotech).

3.1 PREPARATION DU TRACEUR PROGESTERONE 11-A-HEMISUCCINATE- ¹²⁵IODO- HISTAMINE :

Le radiomarquage indirect de la progestérone 11- α -hemisuccinate nécessite la préparation d'un bras radiomarké qui est l'¹²⁵Iodo-histamine, la détermination du rendement de marquage de ce dernier est une étape essentielle avant de le conjuguer à la 11- α -hemisuccinate.

Le marquage de l'histamine par de l'iode¹²⁵ constitue une première étape dans le développement d'une trousse RIA progestérone. L'obtention d'un taux élevé de marquage à ce stade ainsi que l'optimisation de cette procédure représente un atout pour les étapes qui suivent la préparation du traceur progestérone.

3.1.1 .Rendement de marquage du complexe iodo-histamine :

Le rendement de marquage de l'histamine (activité de marquage 357 μ ci) a été déterminé par électrophorèse sur papier. Le radiochromatogramme (**Figure 3.1**), représente la radioactivité par CPM (Coups Par Minute) en fonction du nombre de fractions. Il révèle la présence de deux pics, le premier correspond à l'histamine marquée à l'iode¹²⁵, et le second à l'iode libre (¹²⁵I), qui migre vers le pôle positif.

Le rendement de marquage de l'histamine évalué à 71.2%. En conclusion, sur les 357 μ ci utilisés pour le marquage, 254.04 μ ci correspond au complexe 125 Iodo - histamine.

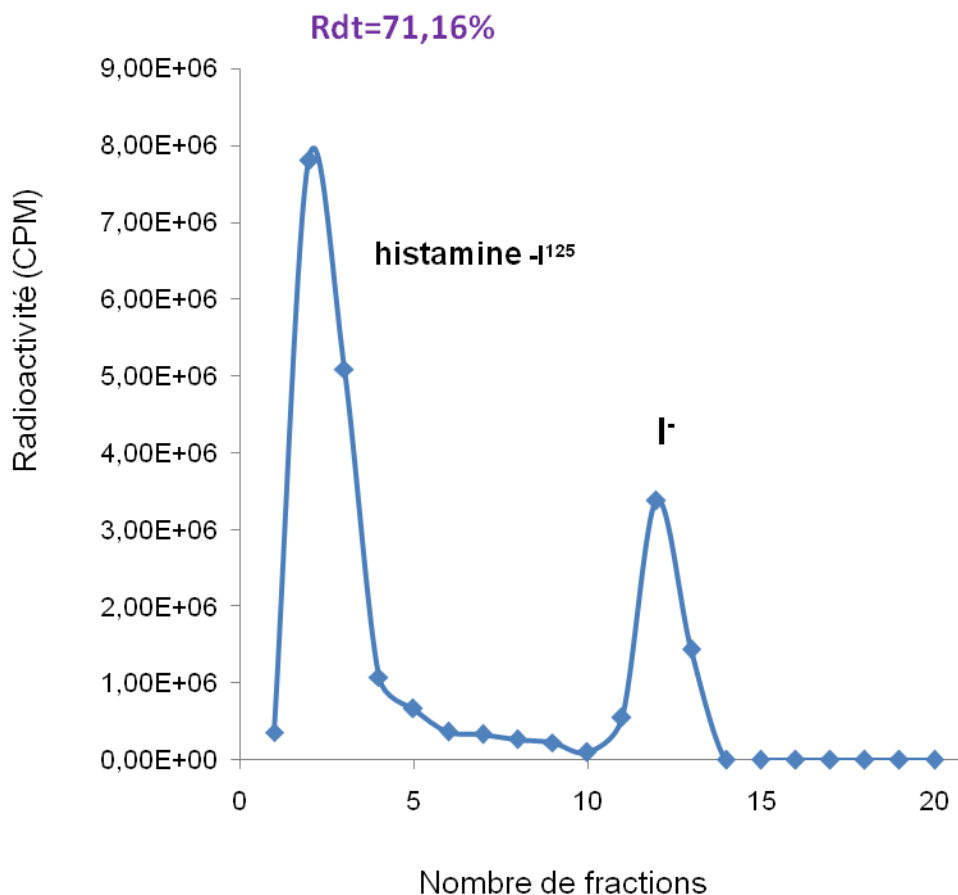


Figure 3.1 : Radiochromatogramme de l'histamine marquée à l'iode 125 (Hist- 125 I) obtenu par électrophorèse sur papier.

Le marquage de l'histamine est effectué selon la méthode décrite par HUNTER et GREENWOOD [117] utilisant la chloramine-T comme agent oxydant, en respectant sa concentration et la durée de réaction présente une méthode de choix pour le marquage des protéines [163]. Cette méthode a permis d'obtenir un rendement de marquage de 71,2% qui est supérieur aux rendements de marquage rapportés par différents auteurs, tels que les travaux de Kothari et Pillai, (1994) [127] et Grace et al (1997) [128], qui obtiennent des rendements respectivement de 50% et de 40-60% avec une quantité de Chloramine T équivalente (50 μ g) mais une durée d'oxydation inférieure (1mn). Karir et al. 2006, obtiennent un rendement de 45-65%, avec une quantité en Chloramine T similaire et une durée d'oxydation allant de deux à trois minutes [122].

3.1.1.1 Etude de l'effet de la durée de stockage du complexe iodo-Histamine sur le rendement de marquage de l'histamine :

Le rendement de marquage de l'histamine marquée à l'iode 125, stockée au congélateur à une température de -10°C est illustré par la **figure 3.2**, elle ne montre aucune dégradation de ce complexe radiomarqué, celui-ci reste stable pendant une durée de stockage de 16 jours. Ce qui permet au manipulateur de mieux gérer dans le temps les activités de marquage et aussi de réaliser plus d'un marquage d'histamine avec les mêmes solutions en réactifs de marquage.

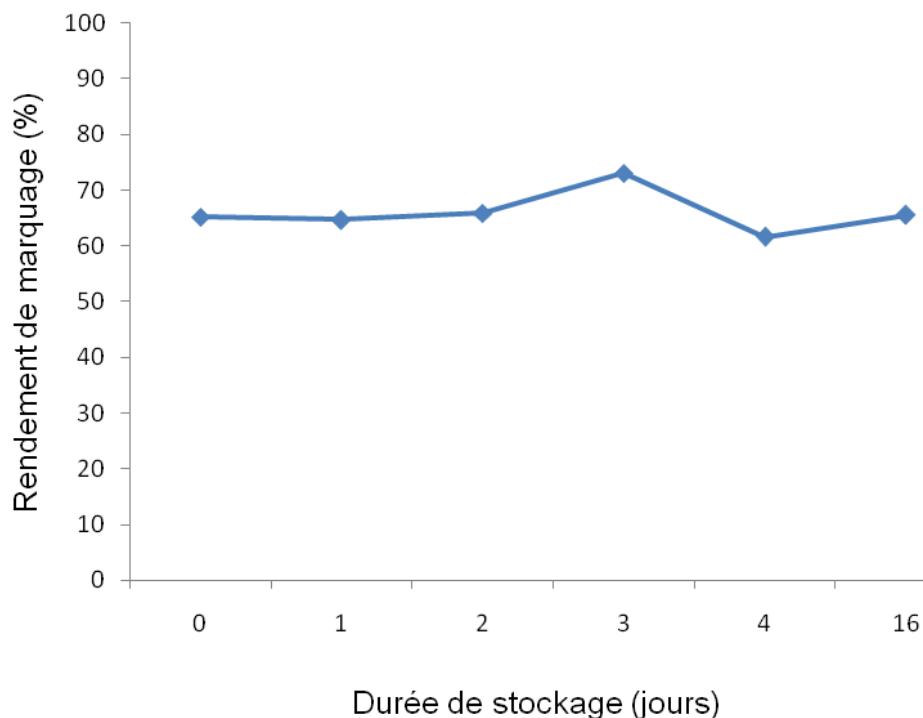


Figure 3. 2 : Stabilité du rendement de marquage de l'histamine en fonction de la durée de stockage à -10°C

3.1.2 Extraction du traceur progestérone 11- α -hemisuccinate- ^{125}I iodo-histamine :

Après activation de la progestérone 11- α -hemisuccinate et sa conjugaison avec le complexe iodo-histamine, l'étape d'extraction nous a permis de collecter trois fractions distinctes. La composition, l'activité et le rendement d'extraction de chaque fraction est rapporté dans le **tableau 3.1**.

Il faut noter l'activité totale des trois fractions ($399\mu\text{Ci}$) est légèrement supérieure à l'activité initiale de marquage ($357\mu\text{Ci}$). Ce type de différences sont en générale attribuées aux erreurs aléatoires de comptage.

Tableau 3.1 : Evaluation des produits de l'extraction de la progestérone marquée

Les fractions	Composition	Activité (µci)	Rendement d'extraction (%)
1	Antigène libre + traces de F2	50	12.53
2	Antigène marqué+ traces de F3	159	39,85
3	Iode libre +histamine-I ¹²⁵	190	47,62
Total	Trois fractions	399	100%

Le rendement d'extraction de la fraction 2 qui correspondant à l'antigène marqué est de 39,85% contre seulement 12.5% pour la fraction 1 et 47.6% pour la fraction 3.

La détermination des puretés radiochimiques des fractions 1 et 3 par électrophorèse sur papier, donne respectivement 95.9% et 3.3%. Les profils d'évaluation de la pureté radiochimiques de ces deux extraits sont illustrés par la **figure 3.3** et les résultats bruts sont présentés au niveau de l'annexe 2. Ces résultats obtenus (activité et PRC) montrent que la nature du contenu de la fraction 1, compte tenu de l'absence de l'iode, est antigénique, alors que celui de la fraction 3 est composé en majorité d'iode¹²⁵ libre.

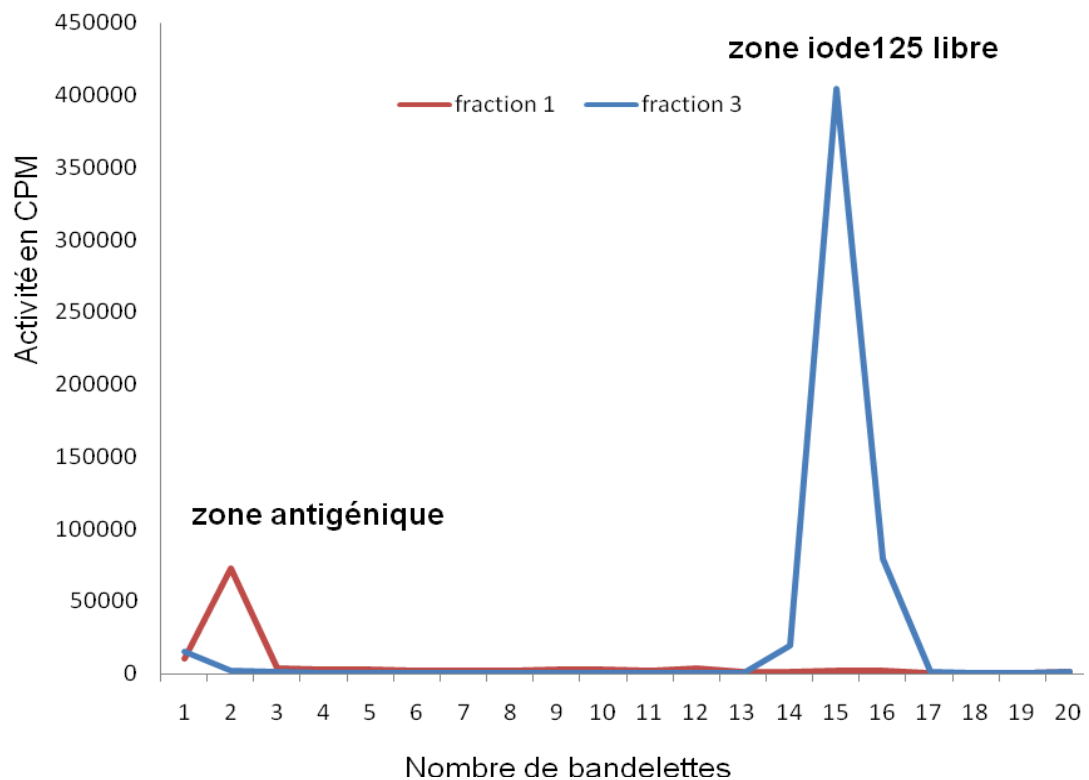


Figure 3.3 : Profils de pureté radiochimiques des fractions 1 et 3

3.1.3 Purification de la progestérone 11- α -hemisuccinate- 125 Iodo-histamine :

Afin d'éliminer toutes les contaminations (I^{125} , histamine marquée) et d'obtenir seulement le traceur pur, la fraction 2 obtenu après extraction subit une purification par chromatographie d'exclusion moléculaire. Le profil d'élution exprimé en radioactivité (CPM) en fonction du nombre de fractions récupérées est présenté sur la **figure 3.4**.

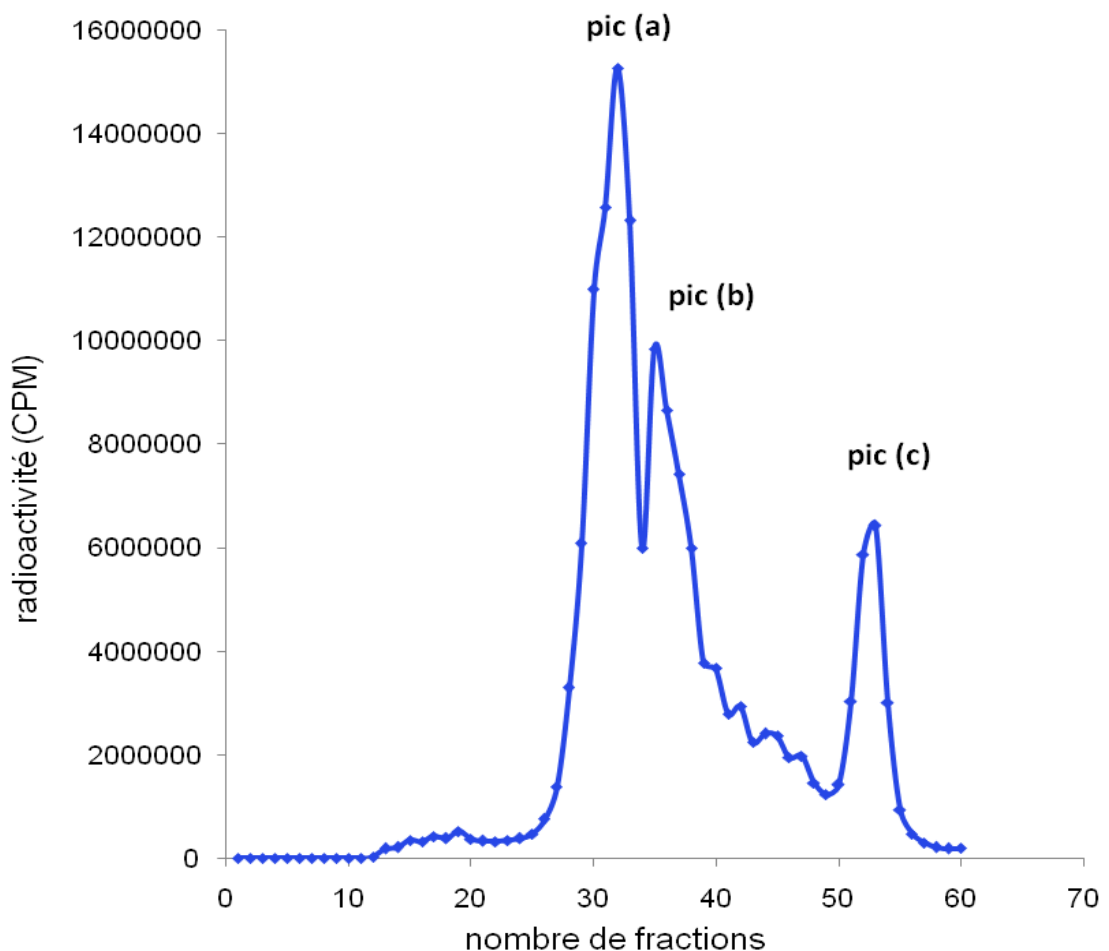


Figure 3.4 : Profil d'élution de la fraction 2 obtenue après purification par filtration sur gel Sephadex G-25.

Ce profil montre la présence de trois pics au niveau de la fraction 2, le pic (a) est élué entre les fractions 24 et 34, le pic (b) est élué entre les fractions 34 et 38. Le pic (c) est élué plus loin entre les fractions 50 et 56, qui présente une très faible activité et poids moléculaire, raison pour laquelle le pic trois est élué en dernier. Les activités obtenues pour chacun de ces trois pics, sont rapportées dans le **tableau 3.2**.

Tableau 3.2 : Activité enregistrée par les trois pics d'élution de la fraction 2

Fraction 2	Activité du pic (cpm)	Rendement de purification (%)
Pic (a)	69 070 840	52.55
Pic (b)	41 662 140	31.70
Pic (c)	20 690 398	15.74
Total	131 423 378	100

D'après le tableau 9, le pic (a) et (b) présentent des rendements de purification les plus importants, avec des proportions respectivement de 52.55% et 31.70%, comparés au pic (c) qui présente une très faible activité et un rendement de purification faible (environ 16%).

La purification par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de sephadex G-25 (Pour des molécules de petite taille) permet de séparer les molécules marquées non endommagées des contaminants et des produits de dégradation présents dans le mélange réactionnel. De nombreux auteurs ont fait de ce type de purification une méthode de choix pour les traceurs radioiodés [117]. Cependant, il est important de noter que le gel doit être équilibré par des protéines non spécifiques comme la BSA pour réduire les liaisons non spécifiques des molécules marquées. [164]. Karir et al, 2006, obtiennent un rendement de marquage de 15-25% lors d'une extraction au toluène du complexe progestérone-11 alpha-hemisuccinate ¹²⁵Iodohistamine après purification par HPLC [122].

3.1.4 Caractérisation du traceur de la progestérone 11- α -hemisuccinate- iodo-histamine :

3.1.4.1 Contrôle de la PRC et de l'immunoréactivité :

Afin d'évaluer la nature des trois pics (a,b et c) collectés après purification et d'obtenir un traceur le plus pur possible, deux paramètres important sont mesurés, à savoir :

- .La pureté radiochimique par électrophorèse sur papier Wathman ;
- .l'immunoréactivité sur phase solide en mettant en contact les fractions de chacun des trois pics obtenus avec l'anticorps spécifique anti progestérone 11- α -hemisuccinate, dilué en excès à 1/100 et de mesurer après un temps d'incubation, le taux maximum de liaisons spécifique (B0/T).

Les résultats d'évaluation pour chaque pic sont présentés dans le **tableau 3.3**. Les détails sont présentés dans l'annexe 3.

Tableau 3.3 : Caractérisation des pics collectés de la fraction 2

Fraction 2	Pic (a)	Pic (b)	Pic (c)
PRC (%)	97.92	98.70	98.59
Immunoréactivité (%)	43	37	0.31

Les taux de pureté radiochimique des fractions correspondant aux pics (a), (b) et (c) sont élevés et sont respectivement de 97.92%, 98.70% et 98.59 (**Figure 3.5**). Elles traduisent l'absence de l'iode, donc une nature antigénique. Le taux d'immunoréactivité obtenu par les fractions correspondant au pic (c) est de 0.31%, il est très faible comparé à celui obtenu par les fractions correspondant aux pics (a) et (b), respectivement de 43% et 37%. Il est donc confirmé avec certitude, que les fractions du pic (c) contrairement aux pics (a) et (b) ne constituent pas un traceur progestérone. De plus, étant donné que le taux de PRC obtenu (>98%) par ces fractions du pic (c), il ne peut s'agir que de l'iodohistamine non conjuguée.

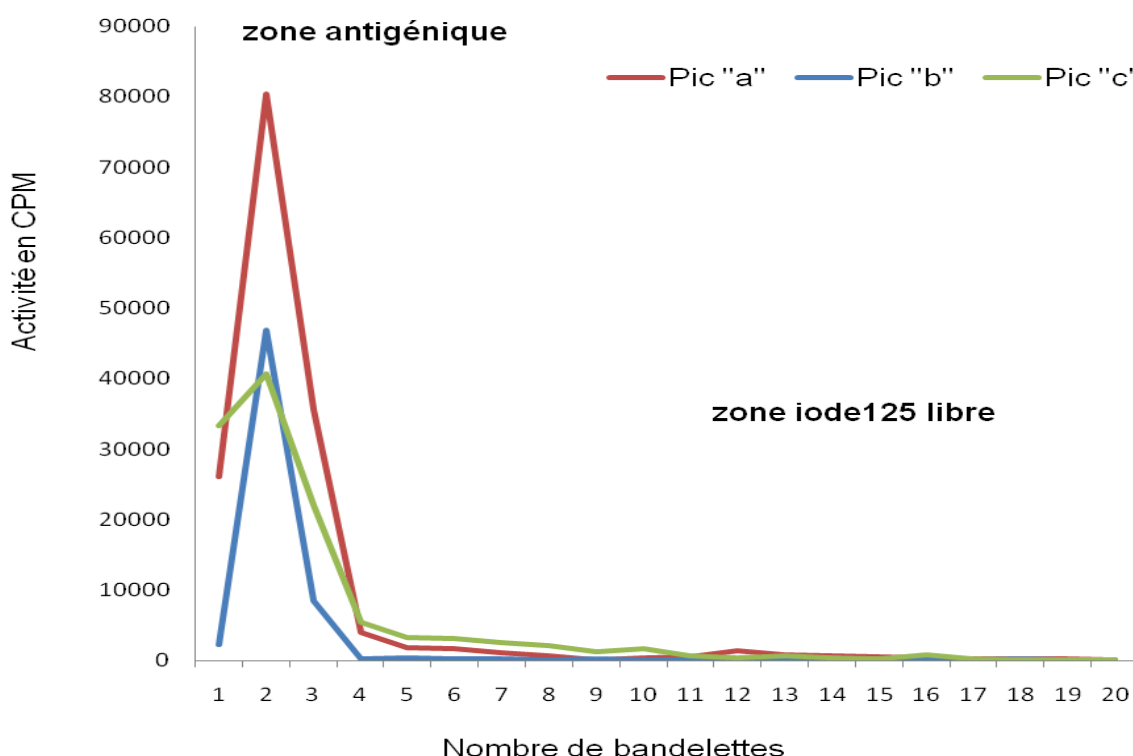


Figure 3.5 : Profils de pureté radiochimiques de la fractions 2 (pics a,b et c)

Les taux élevés d'immunoréactivité et de PRC enregistrés par les fractions correspondant aux pics (a) et (b) permettent de confirmer d'une part, que la nature du contenu de ces fractions représente le traceur progestérone 11- α -hemisuccinate- iodo-histamine. L'obtention de deux traceurs (pics (a) et (b)), est la conséquence de la formation, dans les conditions de notre expérimentation, de deux entités lors du marquage de l'histamine, à savoir, la mono-iodohistamine et la di-iodohistamine. Il ressort que le traceur progestérone di-iodohistamine correspond aux fractions du pic (a) et le traceur progestérone mono-iodohistamine correspond aux fractions du pic (b).

La pureté du traceur iodé conditionne la spécificité du dosage, elle influe également sur la limite de détection et l'exactitude des résultats (diminution du taux des LNS) [137]. Les valeurs de la PRC obtenus se trouvent dans la limite requise par les normes CIS ($\geq 90\%$). Ces résultats sont similaires à ceux obtenu par Karir et al, 2006 [122]. Le nombre d'iode incorporé dans l'histamine dépend des conditions de marquage, à savoir le pH du milieu réactionnel et la durée de la réaction d'oxydation. En effet, le marquage de l'histamine à pH 8 favorise la formation de la mono-iodohistamine, qui permet l'obtention de traceurs plus stables que la di-iodohistamine et la tri-iodohistamine [131]. L'incorporation de plus d'un iode radioactif sur une molécule, qui plus est une haptène, favorise les réactions de radiolyse et fragilise la stabilité de la molécule marquée.

3.1.4.2 Activité spécifique et activité volumique :

Les valeurs de l'activité spécifique et volumique des traceurs préparés (fractions des pic a et b) sont présentées dans le **tableau 3.4**.

Tableau 3.4 : Caractérisation des traceurs par mesure de l'activité spécifique et volumique

Les activités / traceurs	Pic (a)	Pic (b)
Activité spécifique ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	6,87	
Activité volumique ($\mu\text{Ci}/\text{ml}$)	9.43	4.39

Sachant la masse totale de progestérone 11 α hemisuccinate mise en activation de 23.15 μg et l'activité obtenue par la fraction 2 après extraction de 159 μCi , une activité spécifique approximative a été calculée pour l'ensemble de cette fraction correspondant au traceur.

Les valeurs de l'activité spécifique et volumique enregistrées sont faibles en raison de la faible activité de marquage (357 μCi). Celle-ci ne représente que 35.7 % de l'activité de marquage (1000 μCi) rapportée par d'autres auteurs [131].

L'activité spécifique d'un traceur est la conséquence directe de la proportion du radioisotope introduit par molécule à marquer. L'augmentation de l'activité spécifique du traceur conditionne directement la limite de détection du dosage [165], alors qu'une faible activité spécifique entraîne un faible rendement de détection, de ce fait une faible sensibilité du dosage [166].

3.1.5 Contrôle de la stabilité :

Après la préparation d'un traceur, des phénomènes de radiolyse peuvent être à l'origine de dégradations dans le temps des molécules marquées, pour cette raison, il est nécessaire de déterminer la stabilité du traceur préparé.

Pour la réalisation de cette étude de stabilité, nous avons choisi le traceur progestérone 11- α -hemisuccinate-monoiodo-histamine, correspondant aux fractions du pic b ou traceur F2b. Celui-ci présente l'avantage d'être moins affecté par la dégradation [131]. La stabilité du traceur a été étudiée pour les températures de stockage de 10°C et de -6°C, à travers le suivi de la pureté radiochimique et de l'immunoréactivité en présence de l'anticorps spécifique à la progestérone, dilué à 1/300, en phase solide.

3.1.5.1 Contrôle de la pureté radiochimique :

Les résultats de l'évolution de la pureté radiochimique pour le traceur F2b stocké à 10°C et à -6°C sont représentés sous forme de courbes en fonction du temps (**Figure 3.6**). Durant la période de l'étude de la stabilité qui équivaut environ trois (03) mois, le traceur F2b stocké à une température de 10°C et -6°C donne une moyenne de pureté radiochimique stable, qui est respectivement de 96.58 \pm 1.67% et 98.52 \pm 0.72%.

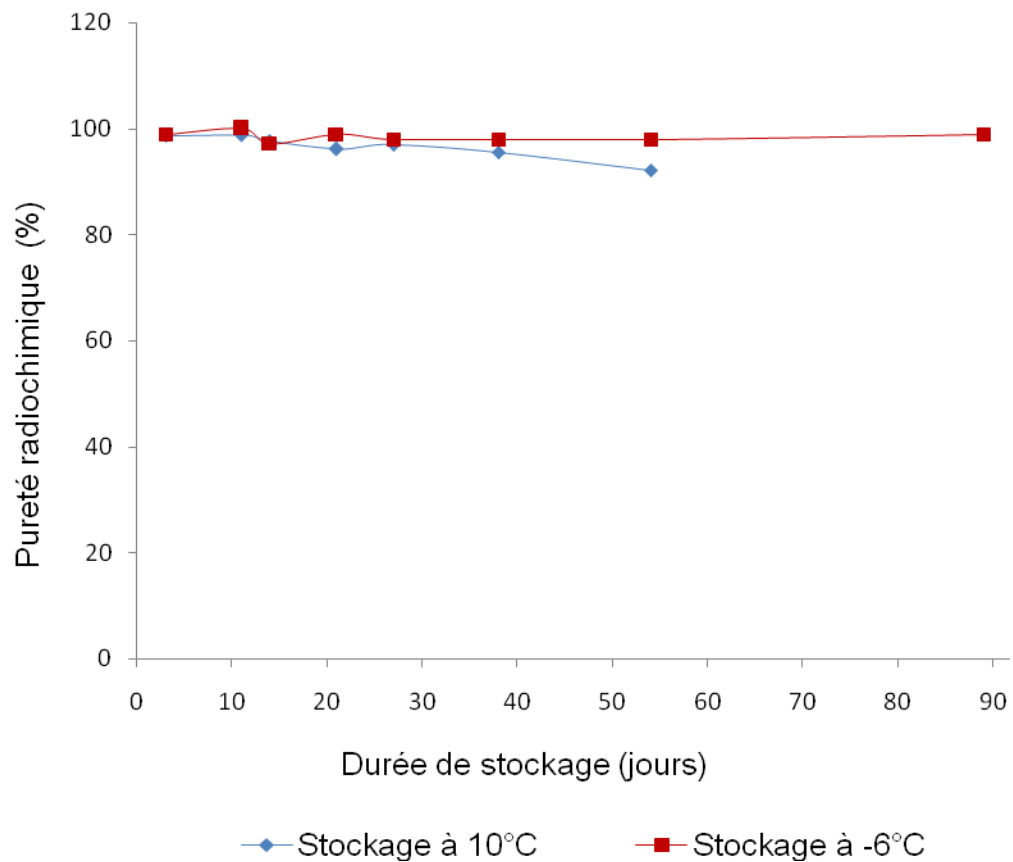


Figure 3.6 : Evolution dans le temps de la pureté radiochimique du traceur F2b stocké à 10°C et – 6°C.

3.1.5.2 Contrôle de l'immunoréactivité :

Les résultats d'immunoréactivité spécifique (Bo/Tc) et non spécifique (B/T) obtenus par le traceur (F2b) stocké à 10 °C et à -6°C en fonction du temps, sont représentés sous forme de courbes, illustrées par la **figure 3.7**.

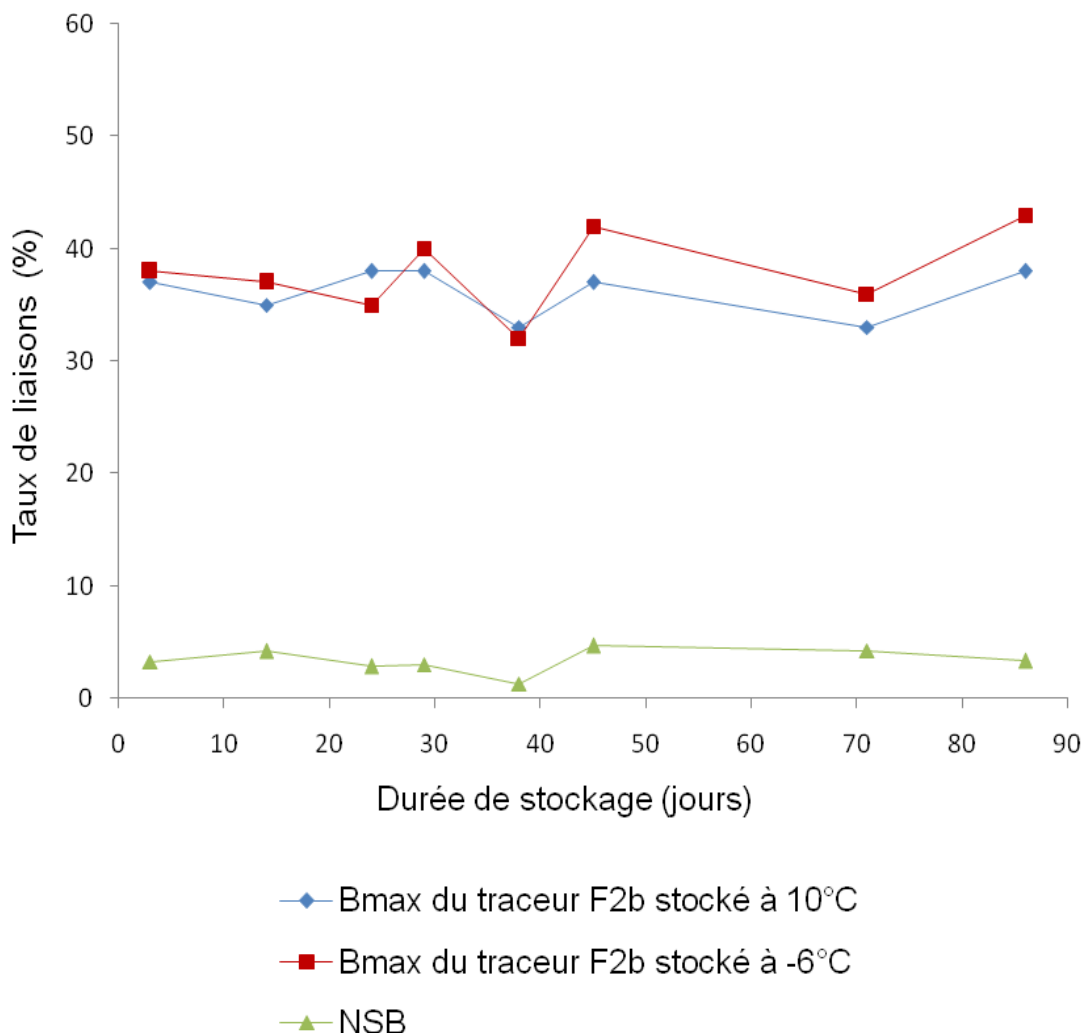


Figure 3.7 : Evolution dans le temps des taux de liaisons spécifiques et non spécifiques du traceur F2b stocké à 10°C et – 6°C

Le pourcentage de liaisons spécifiques enregistré est en moyenne de $36.12 \pm 1.8\%$ et $37.87 \pm 2.8\%$ respectivement pour le stockage à une température de 10°C et de -6°C. Aussi, le taux moyen de LNS enregistré est de $3.33 \pm 0.76\%$, il est inférieur à la norme admise pour ce type de dosage, qui est de 5% [167].

Il ressort de cette étude, à travers les deux paramètres étudiés, que le traceur préparé, stocké à la température de 10°C ou de -6°C, conserve ces performances physicochimique et immunologique tout le long des 3 mois de stockage.

Durant la conservation d'un traceur radioiodé, différents facteurs (fortes activités de marquage, pH du tampon, température de stockage) sont responsable de sa dégradation. Cette stabilité est cependant variable d'un traceur à l'autre [137]. La diminution de la stabilité est due aux effets de radiolyse qui sont d'autant plus importants pour les traceurs ayant une activité spécifique élevée, en raison de

marquage avec des hautes activités (1mci). Hegen et al.1980 rapportent des résultats similaires aux notre, concernant la relation étroite entre la stabilité du traceur et l'activité spécifique. Il ressort que plus l'activité spécifique d'un traceur est faible plus la stabilité de ce dernier est meilleure [168].

3.2 CARACTERISATION DES ANTICORPS POLYCLONAUX :

En raison de leurs faible poids moléculaire, la progestérone et ces métabolites ne sont pas directement immunogénique. Pour se faire, ils requièrent un couplage préalable à une protéine porteuse telle que le bovin sérum albumine (BSA) pour inciter une production d'anticorps. Au niveau du noyau stérol de la progestérone, le couplage peut se faire sur le cycle A, en position C1 ou C3, le cycle B, en position C6 ou C7, le cycle C, en position C11 et sur le cycle D, en position C20 ou C21 [169]. Actuellement, tous les travaux traitant de la production des anticorps anti-progestérone ont montré que pour des raisons d'encombrement stérique, les meilleurs antisérums, sont obtenus quand les groupements carbonyles des cycles A et D de la progestérone sont libres [153, 170]. De ce fait, le conjugué progestérone 11 α hemisuccinate-BSA a été choisi comme immunogène pour la réalisation de ce travail. Par ailleurs, des travaux bibliographiques rapportent que l'utilisation de l'immunogène couplé à l'albumine bovine en position 11 affecte considérablement la sensibilité du dosage radioimmunologique, mais les antisérums produits seront plus spécifiques et les taux de réaction croisée très faibles [123,171].

3.2.1 Evaluation du titre :

Les titres des antisérums prélevés sur les lapins ont été évalués par dosage radioimmunologique, phase liquide (PEG/B γ G), utilisant le traceur progestérone 11- α hemisuccinate monoiodo-histamine.

Les sérums sont testés au fur et à mesure de l'étape d'immunisation jusqu'à la saignée finale, afin de vérifier le bon déroulement de celle-ci et d'avoir un premier élément sur la qualité des antisérums.

Les résultats des réponses immunitaires, représentées par le pourcentage de liaisons Bo/Tc, obtenus au cours de cet essai de production d'anticorps, étalé sur une durée de 8 mois d'immunisation, incluant 9 rappels, sont présentés dans les **tableaux 3.5a et b** respectivement pour le lapin A et B et ils sont illustrés par les **figures 3.8 a et b**.

Tableau 3.5a : Pourcentage de liaisons maximums (Bo/Tc) des antisérums obtenus par le lapin A au cours de huit (08) mois d'immunisation

Titres	Rappels du lapin A						
	3	4	5	6	7	8	9
Pur	88,43	82,00	85,00	83,00	85,00	88,00	85,00
1/10	60,44	82,00	85,00	83,00	83,00	85,00	85,00
1/50	43,00	81,65	85,00	81,00	79,00	75,00	85,00
1/100	36,00	74,18	75,00	77,00	68,00	67,00	85,00
1/250	22,00	59,50	60,15	74,00	55,00	58,00	85,00
1/500	12,00	45,11	41,35	68,11	48,77	44,33	85,71
1/1000	6,00	32,83	25,48	46,52	24,87	23,76	80,61
1/2000	3,00	21,46	14,99	27,19	15,63	14,73	76,02
1/4000	2,00	8,00	10,00	19,09	10,00	9,00	61,42
1/5000	0,00	3,00	6,00	16,00	7,00	5,00	55,53
1/6000	0,00	0,00	0,00	11,00	3,00	2,00	50,36
1/8000	0,00	0,00	0,00	8,00	0,00	0,00	45,55
1/10000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	37,65
LNS	4.70	5.86	4.48	3.64	6.31	6.14	3.2

Tableau 3.5b : Pourcentage de liaisons maximums (Bo/Tc) des antisérums obtenus par le lapin B au cours de huit (08) mois d'immunisation

Titres	Rappels du lapin B							
	3	4	5	6	7	8	9	sacrifier
Pur	88,64	76,88	82,45	77,11	80,11	82	84,29	88,85
1/10	73,24	71,67	82,45	77,11	80,11	82	84,29	88,85
1/50	67,43	66,55	72,13	77,11	80,11	82	84,29	88,85
1/100	54,14	49,01	67,8	77,11	80,11	82	84,29	88,85
1/250	33,75	30,78	54,93	77,11	80,11	82	84,29	88,85
1/500	22,44	20	38,15	72,64	78,99	77,01	84,29	88,85
1/1000	10,38	14,35	25,08	47	58,49	57,4	84	87,45
1/2000	7,1	9,39	14,44	29,45	37,28	38,95	82,17	85,69
1/4000	4,66	3,15	9,11	17,81	22,05	23,88	72,29	82,77
1/5000	2,88	3,01	4,67	7,66	12,45	10,34	68,5	66,75
1/6000	1,95	1,46	2,66	1,33	8,34	8,63	53,87	62,62
1/8000	1,11	0	1,34	0	6,23	6,92	45,41	40,79
1/10000	0,25	0	0	0	4,67	2,44	43,56	32,8

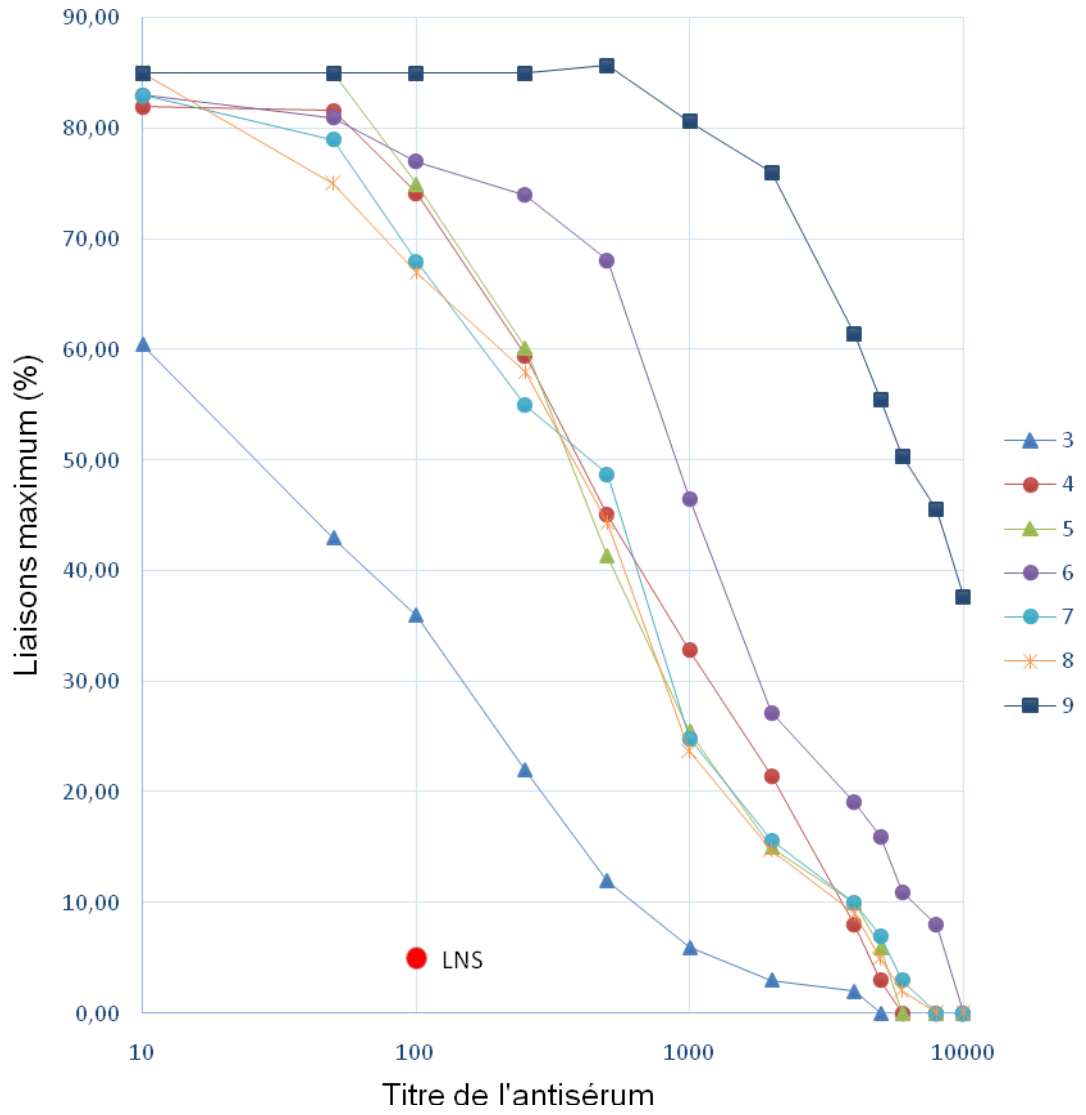


Figure 3.8a : Titre de l'antisérum du lapin A en fonction des rappels

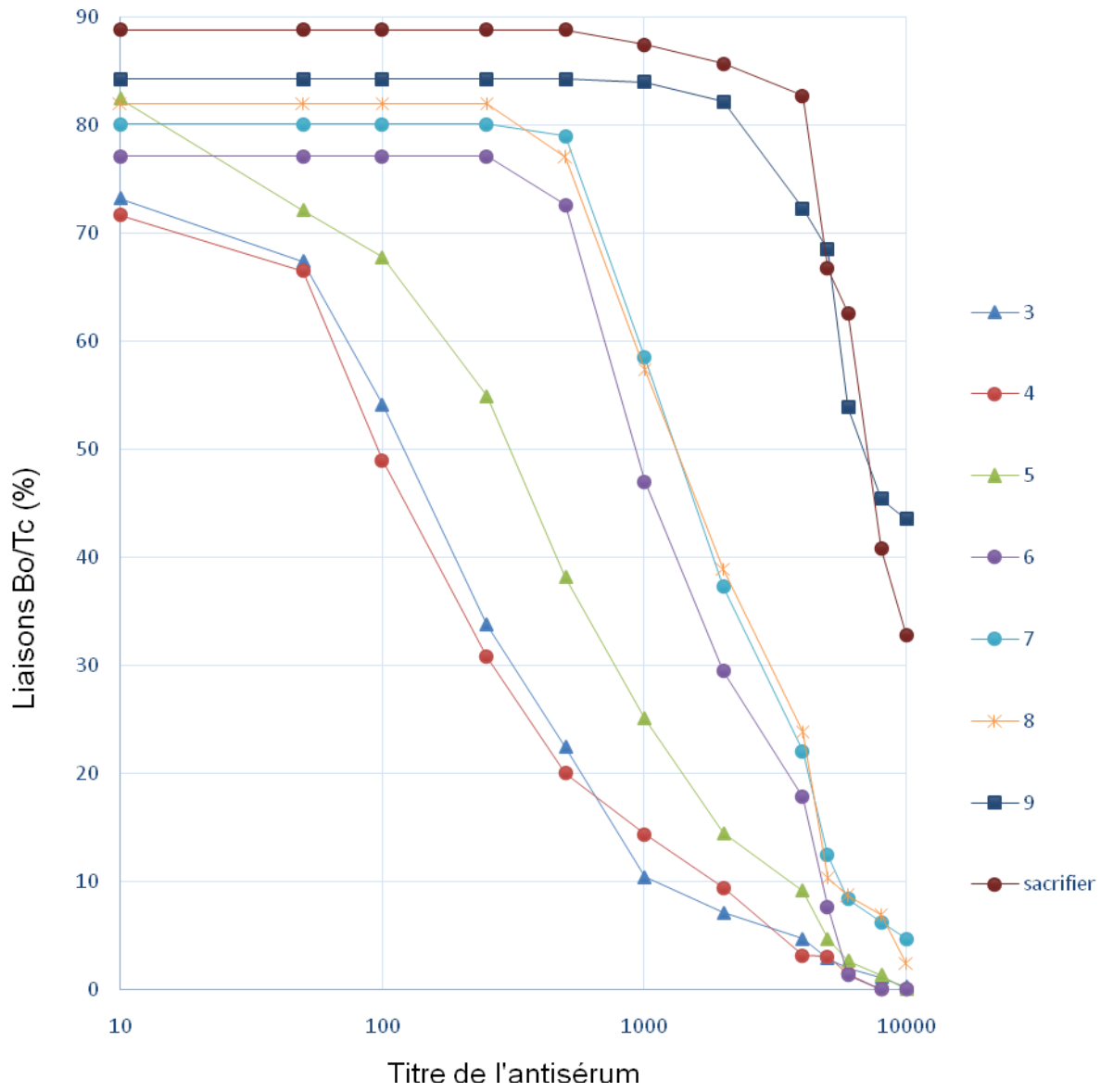


Figure 3.8b : Titre de l'antisérum du lapin B en fonction des rappels.

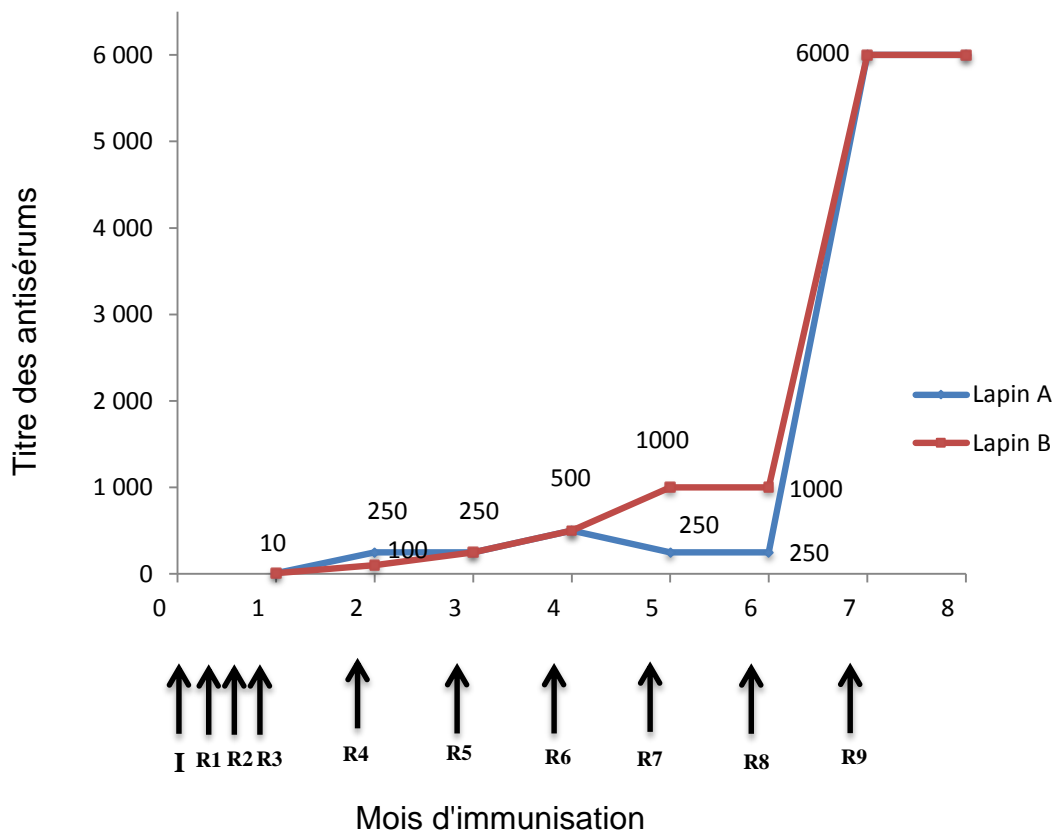
Les interférences non spécifiques liées à la qualité du traceur utilisé pour la détermination des titres des antisérums des deux lapins, tout le long de la durée de l'immunisation, exprimées par le taux de liaisons non spécifiques (LNS) sont satisfaisantes et sont en générale inférieures à la norme admise en RIA (< 5%).

Le titre des antisérums produits après 6 mois d'immunisation connaît une évolution lente. Après le 3^{ème} rappel, correspondant au premier prélèvement de sang, les lapins A et B enregistrent des titres des antisérums produits de 10. La réponse immunitaire du lapin A marque une première hausse du titre à 250 au 4^{ème} rappel, atteint 500 après le 6^{ème} rappel et décroît à 250, malgré l'administration d'injections de rappels (7^{ème} et 8^{ème} rappels). Bochskañl et al, 1989 rapportent une décroissance du titre après qu'il ait atteint des pics à 12-18 semaines d'immunisation, puis croit à nouveau à 38 semaines d'immunisation, atteignant des pics de valeurs équivalentes aux premiers à 52 semaines [170].

Le titre des anticorps du lapin B connaît une hausse graduelle en fonction des rappels pour atteindre 1000 après le 7^{ème} rappel et il reste stable au 8^{ème} rappel. Après 7 mois d'immunisation (9 rappels), ce titre connaît une autre augmentation significative pour atteindre 6000 pour les 2 lapins (**Figure 3.9**).

Après 8 mois d'immunisation et suite à un manque en immunogène à injecter, les lapins ont été sacrifiés. Le titre final des antisérums après sacrifice s'est stabilisé à 6000.

L'étude menée montre que le titre des antisérums obtenus chez les 2 lapins, après 9 rappels, est satisfaisant en comparaison avec les titres obtenus par Bochskañl & al ; 1989 (1/1400) [170] et Miyachu; 1978 (1/1750) [172]. Il est cependant faible, en comparaison avec les résultats des travaux de Scarisbrick & Cameron; 1975 (1/60000) [173], Dighe et Hunter 1974 (1/30000) [174], Kothari et al 1995, Espinosa & al, 1984 (1/105000) [124,175], Brochu et al 1984 (1/300000) [176], Karir et al 2006 (1/12000) [177], obtenus avec un même immunogène (progestérone-11 α -HS-BSA).



I : Immunisation
 R : Rappel

Figure 3.9 : Evolution des titres des antisérums des lapins A et B au cours de 8 mois d'immunisation.

3.2.2 Evaluation de la spécificité :

Après avoir déterminé le titre des antisérums (6000), celui-ci est utilisé pour la détermination de leur spécificité par dosage RIA de compétition, phase liquide, en présence des différents stéroïdes en gamme étalons : Progestérone (P), 11 α hydroxyprogestérone-HS (PHS), la 5 α pregnane-3,20-dione (5 α PD) et la 11-Deoxycorticosterone (11DCS).

Les résultats d'immunocompétition obtenues, exprimés en pourcentage de liaisons B/Bo, en fonction de la variation de la concentration de chacun des stéroïdes testés en une gamme étalons, sont présentés dans le **tableau 3.6** et illustrés sous forme de courbes d'immunocompétition (**Figure 3.10**).

Tableau 3.6 : Pourcentage de liaisons (B/Bo) induit par les différents stéroïdes variant en une gamme étalons (ng/ml) avec les antisérums produits

Etalons (PHS)	B/Bo(%)	Etalons Prog	B/Bo(%)	Etalons 5α PD et 11-DCS	B/Bo(%) 5α-PD	B/Bo(%) 11-DCS
0	100					
0,49	80,26	0	100	0	100	100
1,11	67,34	0,49	92,26	10	89,15	95,68
5,48	46,51	10	79,53	40	83,06	92,13
12,67	36,02	80	65,72	80	70,85	86,65
41,23	20,57	160	49,76	160	52,87	77,69

Les résultats obtenus montrent que les antisérums collectés après huit mois d'immunisation par l'immunogène 11α hydroxyprogestérone-HS-BSA, présentent une bonne réaction d'immunocompétition avec le stéroïde 11α hydroxyprogestérone-HS, contrairement aux trois stéroïdes restant. L'allure de la courbe obtenue dénote une bonne sensibilité du dosage (chute du signale à 80% pour une dose d'étalon de 0.49ng/ml) et une bonne spécificité des antisérums (chute du signale à 21% pour une dose en étalon de 40ng/ml).

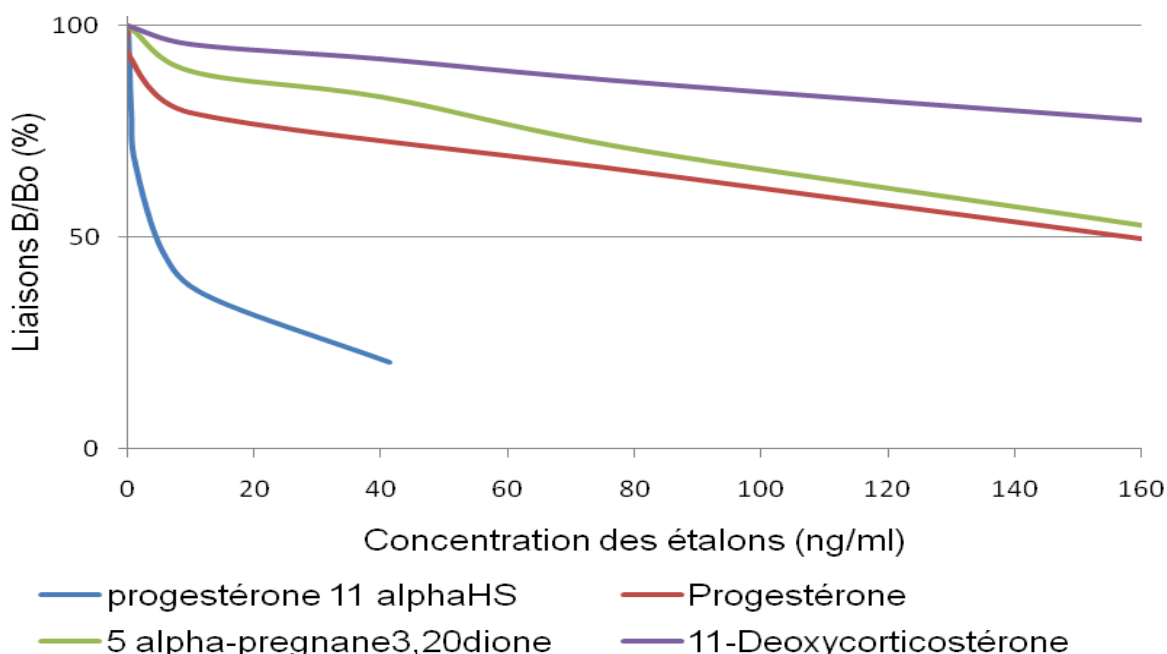


Figure 3.10 : Détermination de la spécificité des antisérums lors d'un dosage RIA de la 11α hydroxyprogestérone-HS, la progestérone, la 5 α pregnane 3,20 dione et la 11- déoxycorticostérone.

Ce résultat non attendu nous a contraint à calculer le pourcentage de réactions croisées (%RC) des antisérums non pas par rapport à la progestérone, mais à la 11 α hydroxyprogestérone-HS. Les pourcentages obtenus sont illustrés par le **tableau 3.7**.

Tableau 3.7 : Spécification des antisérums produits exprimée en pourcentage de réactions croisées (%Rc) obtenus par les différents stéroïdes testés :

Stéroïdes	Concentration (ng/ml) générant 50 % d'inhibition du signal	Pourcentage de réactions croisées
11 α hydroxyprogestérone-HS	4.05	$(4.05/4.05) \times 100 = 100$
progestérone	160	$(4.05/160) \times 100 = 2.53$
5 α pregnane 3,20 dione	202	$(4,05/202) \times 100 = 2.00$
11- déoxycorticostérone	640	$< (4,05/640) \times 100 = < 0.63$

On déduit que le degré de reconnaissance de la progestérone par les antisérums produit, par rapport à la 11 α hydroxyprogestérone-HS est très négligeable (2.53%), il équivaut celui de la 5 α pregnane 3,20 dione. Les antisérums produits ne pourront donc pas constituer la phase solide de la trousse RIA de dosage de la progestérone développée localement. Scarisbrick et Cameron 1975 ; rapportent dans leurs travaux de production d'anticorps anti-progestérone 11 α HS-BSA, un cas similaire d'antisérum qui a présenté une meilleure affinité au traceur progestérone-11 α -HS, qu'a l'étalon progestérone [173]. D'autres travaux ont aussi rapportés des taux élevés de réactions croisées de l'antisérum anti- progestérone 11 α HS-BSA avec la 11 α -Hydroxyprogestérone (Khotari et al.1995 (100%) [124], Westphal, 2012 (>500%) [168]) et la progestérone-11 α -HS (Brochu et al. 1984 (219%) [176])

Fiet et al 1990, rapportent l'existence de réponses individuelles et variables des animaux immunisés, pouvant expliquer une certaine variabilité de la spécificité des anticorps anti-stéroïdes obtenus avec les mêmes immunogènes [171]. Quant à Barnard et al 2013, ils rapportent que dans le cas d'un immunogène conjugué d'un bras le liant à la protéine porteuse, l'antisérum produit liera avec plus d'affinité le conjugué du stéroïde que le stéroïde authentique [178]. Dans le présent travail, le manque en immunogène à limiter le nombre de lapin immunisé et surtout les concentrations en immunogène utilisées lors des rappels et c'est cette raison qui peut être à l'origine de la spécificité à la progestérone défailante des antisérums produits.

3.3 PREPARATION ET ETUDE DE LA STABILITE DE LA PHASE SOLIDE :

3.3.1 Performances de la phase solide :

La séparation des formes libres et liés au cours d'un test d'immunoréactivité est une étape importante pour la qualité du résultat attendu. Pour cela de nombreuses méthodes de séparation ont été développées, la méthode idéale doit être à la fois efficace, simple et reproductible, mais aussi rapide et peu couteuse [179].

Dans cette étude de comparaison des systèmes de séparations phase solide et liquide (Charbon /Dextran, PEG/bovine γ globuline), les essais ont été réalisés avec différents titres d'anticorps (1/100 - 1/2000). Les résultats de taux d'immunoréactivité obtenus par chacune des méthodes de séparation sont illustrés par le **tableau 3.8**.

Tableau 3.8 : Taux d'immunoréactivité en fonction du titre de l'anticorps dans le cas de séparation par Phase solide et phase liquide (Charbon/Dextran et PEG/ B γ G)

Titres	Systèmes de séparation		
	Phase solide	Charbon/Dextran	PEG/bovine γ globuline
1/100	50.12	66.22	72.5
1/200	32.95	59.38	70.54
1/250	25.58	54.78	68.86
1/500	13.34	49.77	62.15
1/1000	8.50	--	--
1/2000	6.60	--	--

La comparaison des systèmes de séparation solide et liquide, des formes libres et liées lors d'essais d'immunoréactivité, a montré l'efficacité du système phase solide comparé aux systèmes de séparation par précipitation (**Figure 3.11**). Les résultats obtenus montrent pour le système phase solide, une chute appréciable du taux de liaisons maximum (Bo/Tc) de 50% à 6% avec l'accroissement du titre des anticorps de 100 à 2000, alors que pour les deux autres systèmes, les taux de Bmax enregistrés restent stables et supérieurs à 50%. Ces résultats nous ont permis de choisir le système de séparation phase solide pour notre trousse RIA.

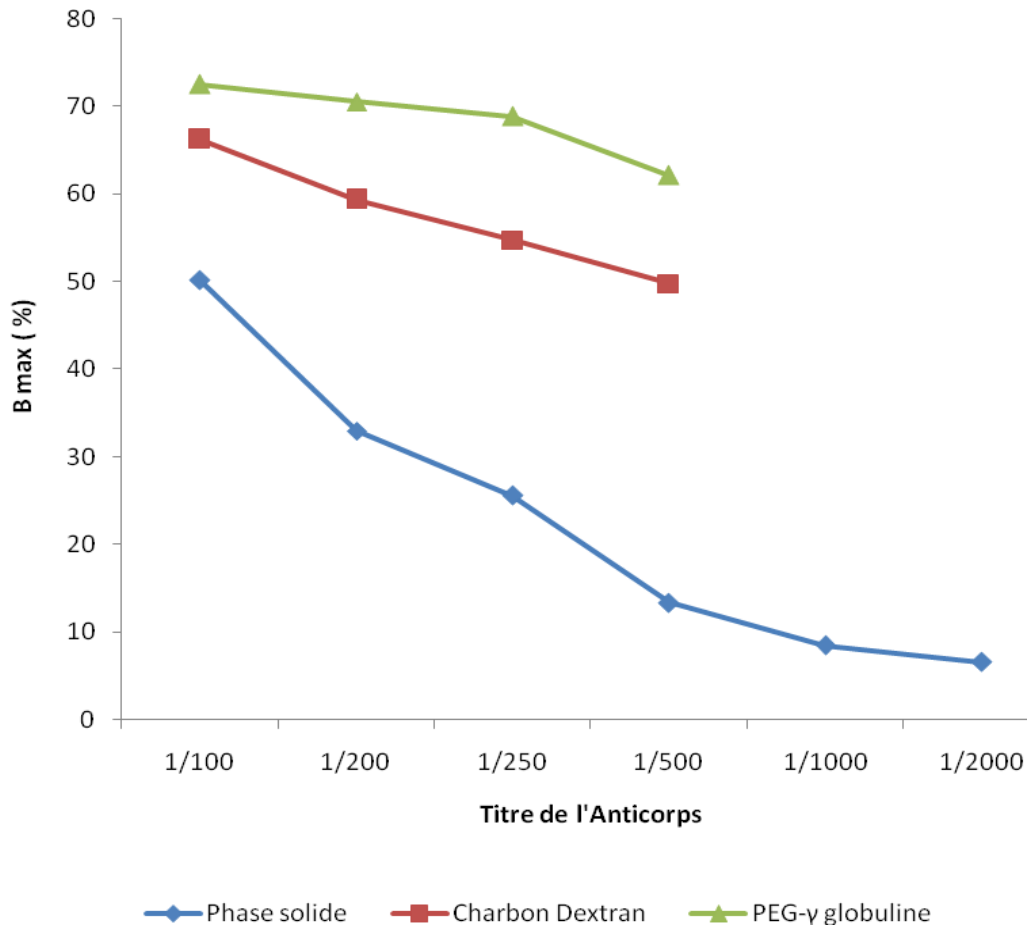


Figure 3.11 : Evolution de l’immunoréactivité en fonction des titres des anticorps pour les systèmes de séparation solide et liquide

Par ailleurs, le système de séparation adopté permet la conservation des propriétés immunologiques des tubes coatés, pendant 12 mois de stockage à 10°C (**Figure 3.12**). En effet, le taux de liaisons maximum moyen obtenu au cours de cette période de stockage est de $43.60 \pm 5.12\%$, avec un coefficient de variation de l’ordre de 12%.

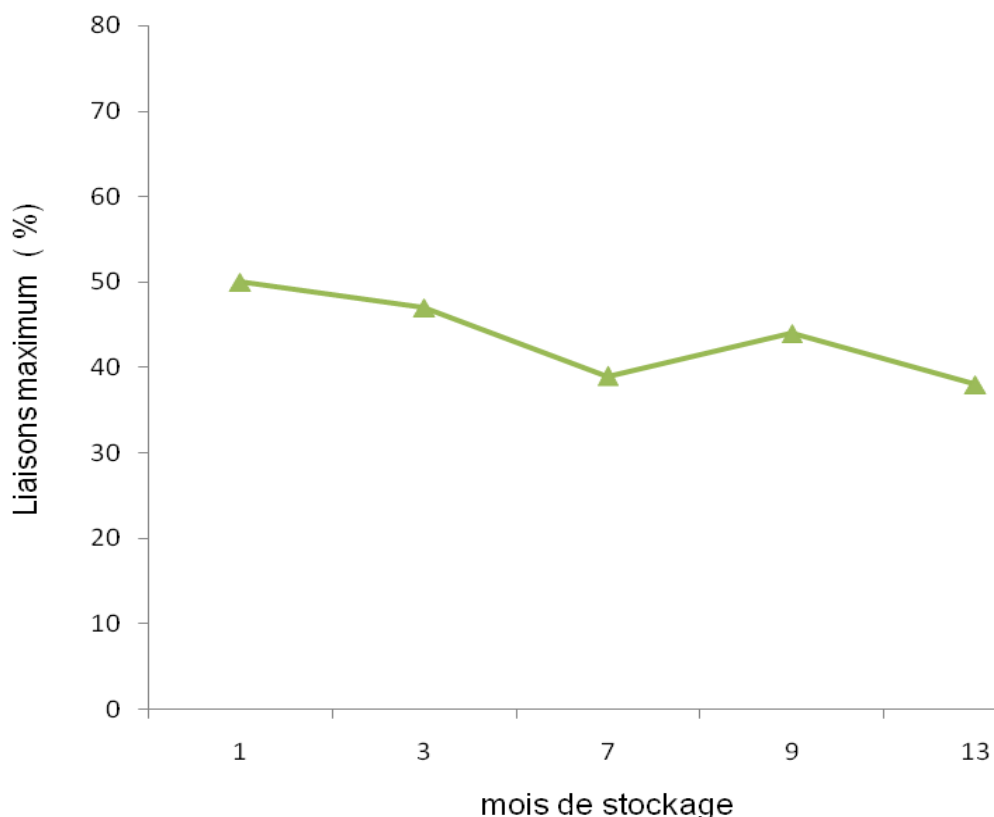


Figure 3.12 : Stabilité de la phase solide en fonction du temps de stockage

3.3.2 Optimisation des conditions de préparation de la phase solide :

Le développement d'une phase solide performante et stable nécessite une optimisation de certains paramètres liés aux conditions de préparation de ce système de séparation [180]. Dans le présent travail, deux paramètres ont été étudiés, il s'agit du titre de l'anticorps et le tampon de saturation des tubes coâtés.

- Concernant le premier paramètre, sachant qu'il faut assurer lors d'un dosage radioimmunologique un taux de liaisons spécifiques maximum supérieur à 25%, les résultats de taux de liaisons maximum (Bmax) obtenus par le système de séparation phase solide, avec les différents titres d'anticorps testés (**Tableau 3.8**), ont permis d'orienter notre choix vers le titre de 300 pour la préparation de la phase solide, destinée aux essais d'immunocompétition. Il est à noter que l'activité spécifique du traceur, l'affinité de l'anticorps pour l'haptène et la quantité d'anticorps spécifiques présent dans l'antisérum constituent des facteurs déterminant du titre des anticorps [181].

- Quant à la nature du tampon de dilution de l'antisérum utilisé lors de la préparation de la phase solide, c'est un tampon carbonate à pH 9.6. les conditions d'incubation du coating sont une température ambiante de 25°C et une durée de 17 à 20heures (toute la nuit), conformément aux conclusions de Butler 2000 et Catt et al 1970 [143,182].
- Pour ce qui est du choix de la nature du tampon de saturation des tubes coatés, les résultats illustrés par le **tableau 3.9** montrent qu'une saturation au tampon phosphate (0.05M :pH7.4, 0.1%BSA, 1% sucrose et 0.1% NaN₃) permet des taux de liaisons maximum meilleurs que ceux obtenus par une saturation au tampon carbonate (0.05M :pH9.6, 0.1%BSA, 1% sucrose et 0.1% NaN₃), soit en moyenne respectivement 36.52±7.89 contre 26.61±7.25. De plus, la saturation par un tampon phosphate enrichi à la gélatine (0.2%), donne un taux de liaisons maximum moyen similaire à celui enrichi par de la BSA (0.1%), soit respectivement 40.90±12.72 et 38.50±9.30. ce qui permet de remplacer par de la gélatine l'utilisation de la BSA et économiser de ce fait ce produit coûteux. Quant aux conditions de saturation, elles sont similaires au coating.

Tableau 3.9 : Effet de la nature du tampon de saturation des tubes après coating sur les taux de liaisons spécifiques

Tampons de saturation	Bmax(%)
Tampon phosphate (TP)	36.52±7.89
TP enrichi à la BSA (0.1%)	38.50±9.30
TP enrichi à la gélatine (0.2%)	40.90±12.72
Tampon carbonate (TC)	26.61±7.25

3.4 PREPARATION, CALIBRATION ET STABILITE DES ETALONS :

3.4.1 Calibration de la solution mère de progestérone :

Le résultat de calibration de la solution mère de progestérone par spectrophotomètre UV a donné une lecture de densité optique (DO) de 0.208. La concentration en progestérone est mesurée selon la loi de Beer-Lambert, exprimée sous la formule :

$$[\text{Solution mère}] \text{ en mol/l} = \text{DO} / \epsilon l.$$

$$[\text{Solution mère}] = 0.208 / 18000 \times 1 = 1.15 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Sachant qu'une mole de progestérone pèse 314.46g, donc la concentration de la solution mère en progestérone est de 3.6162 μ g/ml.

3.4.2 Préparation et calibration des standards dans différentes matrices :

En l'absence d'une trousse commerciale RIA de dosage de la progestérone, validée pour le lait bovin et compte tenu des interférences existantes lors d'un immunodosage, relatives à l'effet matrice [183,184], trois (03) matrices (tampon phosphate, lait incorporé à 50% et lait à 100%) ont été utilisées dans la reconstitution des étalons. Ces derniers ont été calibrés par dosage radioimmunologique de la progestérone, utilisant la trousse Immunotech sérum humain (IM1188).

Les résultats de dosage RIA des étalons progestérone, reconstitués dans les différentes matrices étudiées sont illustrés par le **tableau 3.10** et la **figure 3.13**.

Tableau 3.10 : Concentrations en progestérone (ng/ml) dosées dans les étalons reconstitués dans trois matrices

Standards	Valeurs attendues	Valeurs obtenues		
		Tampon phosphate (TP)	Lait bovin incorporé à 50%	Lait bovin incorporé à 100%
0	0	0	0.13	0.32
1	0,625	0.55	3.32	4.60
2	1,25	1.15	4.48	6.21
3	2,5	2.31	7.84	9.46
4	10	10.24	20.00	24.46
5	40	40.96	48.75	69.31

Ces résultats indiquent d'une part, des concentrations en progestérone des étalons préparés dans la matrice tampon phosphate (zéro lait), très fortement corrélées ($r=0.999$) avec les concentrations attendues et d'autre part, une hausse des concentrations de progestérone dans les étalons lait écrémé, à mesure que le taux d'incorporation du lait bovin dans la matrice des standards est augmenté à 50% et à 100%. L'analyse de régression linéaire appliquée aux concentrations de progestérone obtenues dans la matrice tampon phosphate par rapport aux

concentrations de progestérone attendues d'une part (**Figure 3.14a**), et par rapport aux concentrations de progestérone obtenues dans les matrices lait incorporé à 50% puis à 100% d'autre part (**Figures 3.14b et c**), donne des coefficients de détermination "r²" respectivement de 1, 0.976 et 0.990, traduisant la relation entre la distribution des points et les équations des droites de régressions obtenues. Celles-ci sont respectivement sous la forme : $y=1.027x + 0.104$ (a), $y=1.131x + 3.683$ (b) et $y=1.614x + 4.207$ (c).

Les paramètres relatifs à ces équations de régressions (pente et ordonnée à l'origine) fait apparaître l'effet de l'introduction du lait dans la matrice tampon sur les valeurs de la progestérone dosées par une trousse commerciale sérique.

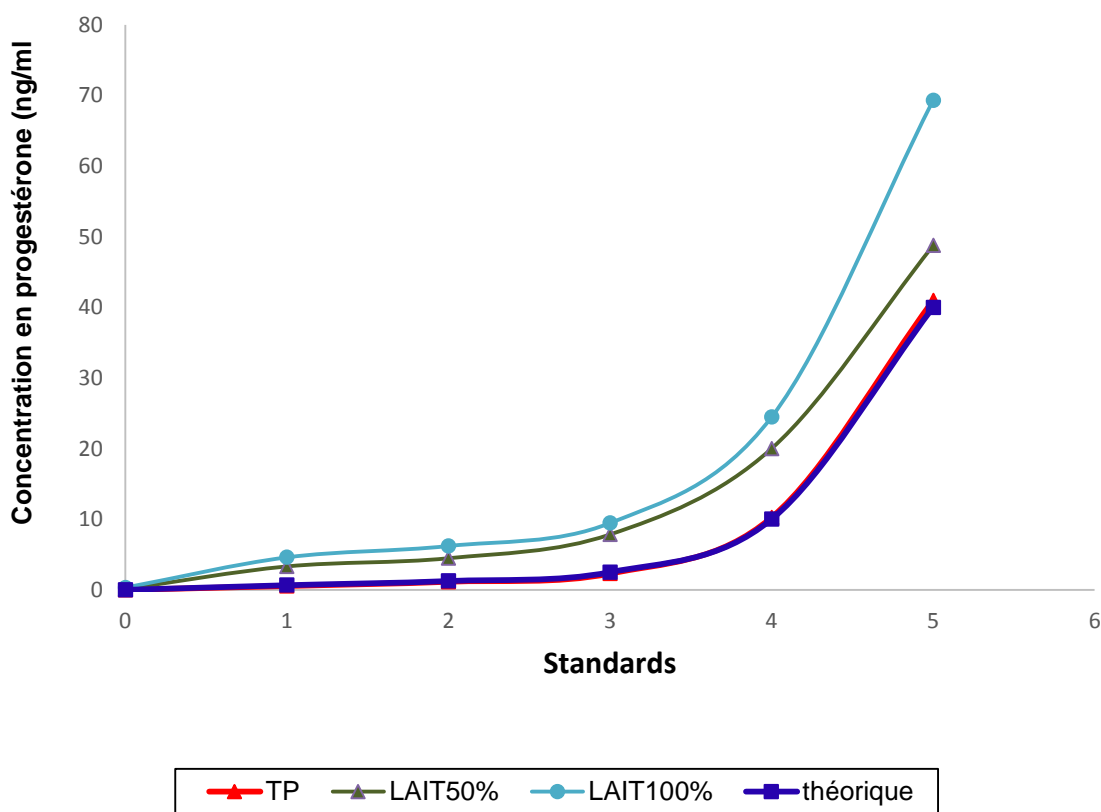
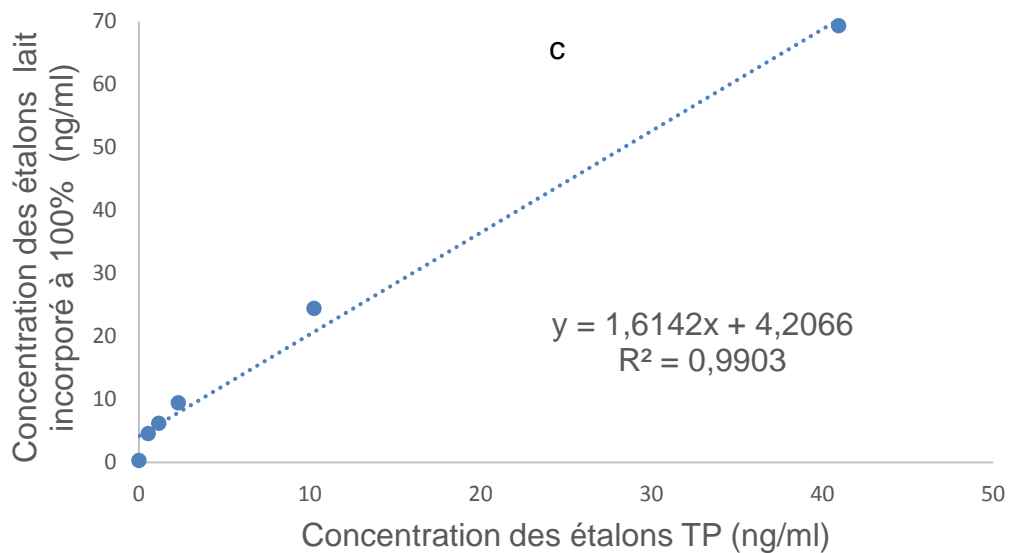
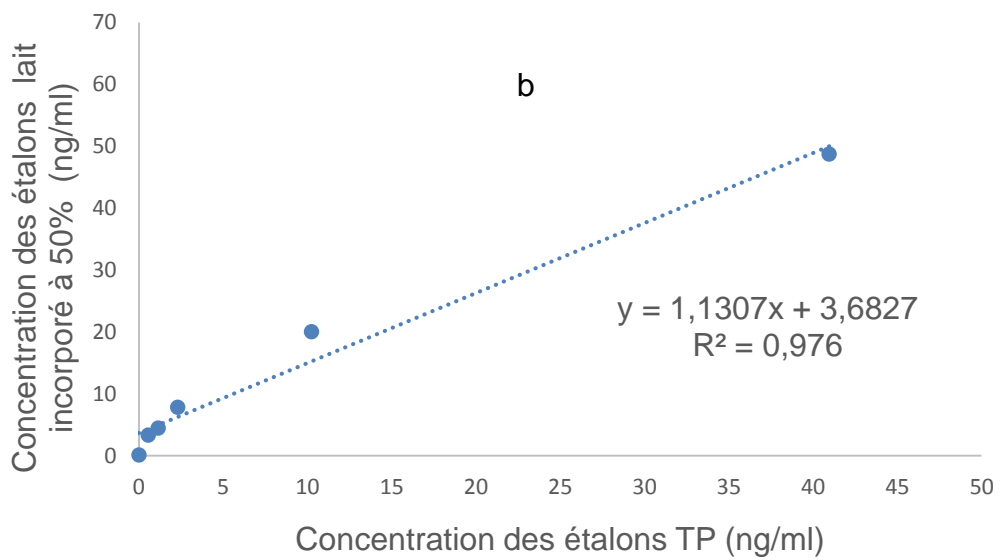
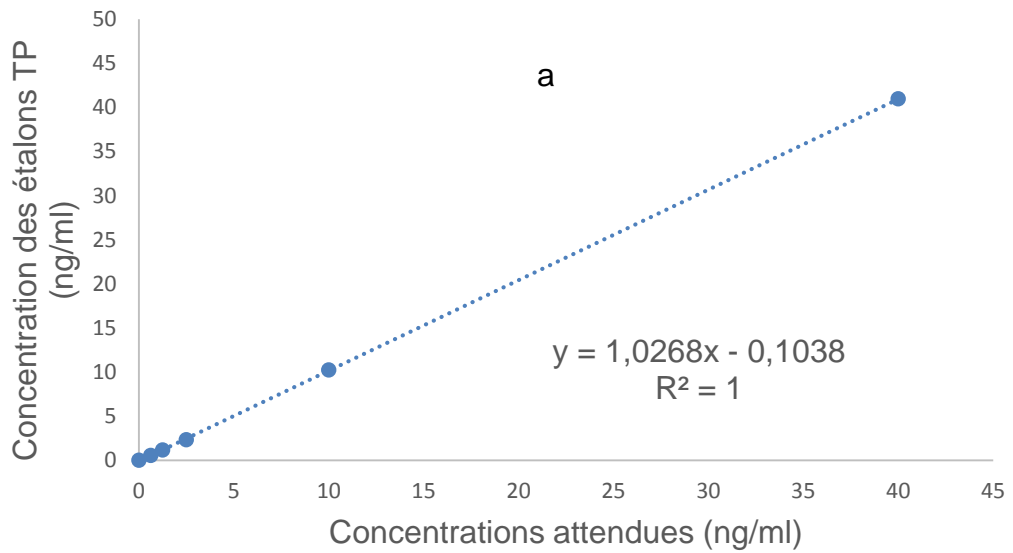


Figure 3.13 : Taux progestéronémique des étalons reconstitués dans trois Matrices, dosés par RIA/Immunotech.



Figures 3.14 : Courbes de régression linéaires des concentrations de progestérone dosées dans les différentes matrices

Aussi, la **figure 3.15** représente le tracé des courbes d'étalonnage obtenues lors d'un dosage RIA, avec des étalons progestérone de la trousse Immunotech et les étalons tampon phosphate préparés et calibrés localement.

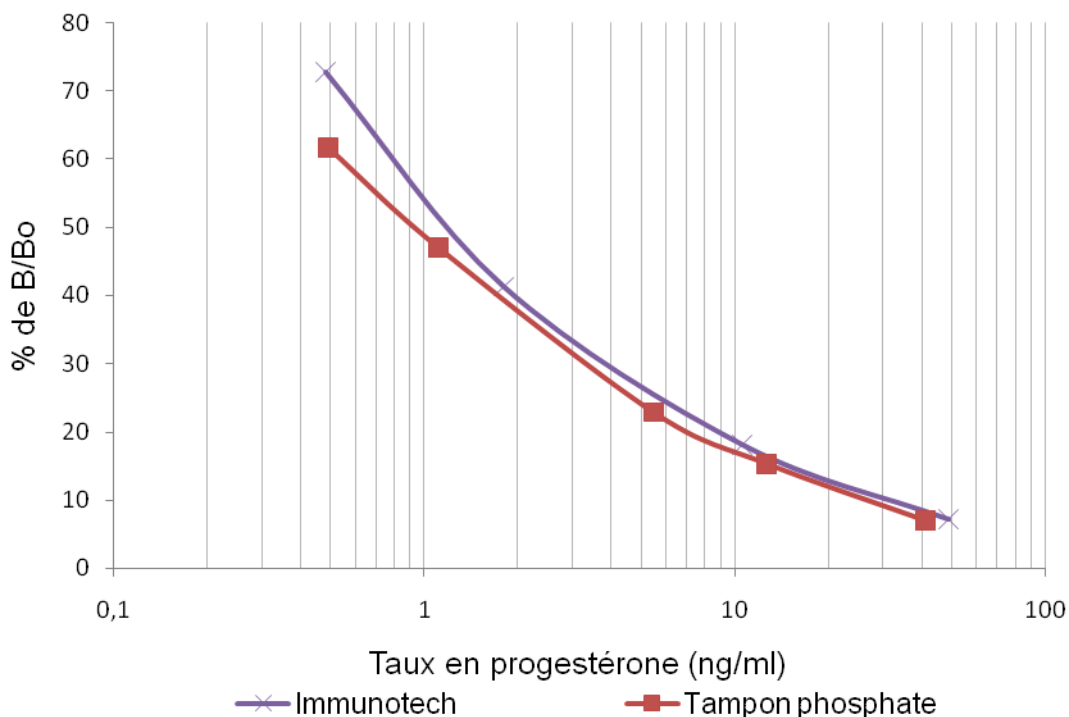


Figure 3.15 : Courbe d'étalonnage de dosage de la progestérone

Il apparaît une similitude entre les courbes d'immunocompétition obtenues avec les étalons sériques humains de la trousse Immunotech et les étalons TP préparés, celles-ci sont presque superposables. Quant aux paramètres liés à la performance du dosage de chacune des courbes d'immunocompétition obtenues, tels que la liaison maximale (Bo/Tc) et la détection limite, ils sont très satisfaisants. Les valeurs obtenues sont respectivement de **55.2%** et **0.05ng/ml** pour la matrice sérique humaine et de **60%** et **0.03ng/ml** pour la matrice tampon phosphate. Ces résultats nous permettent de déduire que la trousse commerciale RIA Immunotech de dosage de la progestérone validée pour le sérum humain peut éventuellement être utilisée pour le dosage de la progestérone dans les échantillons sériques bovins en absence de trousse spécifiques, mais elle ne peut à aucun cas servir d'étalon secondaire pour la calibration des étalons progestérone préparés dans une matrice lait bovin déplété. A défaut d'une calibration par une trousse commerciale validée pour le dosage de la progestérone dans le lait bovin, ou par l'usage d'une technique connexe, telle que la CG-MS, l'utilisation de la matrice tampon phosphate pour la préparation des étalons constitue une excellente

alternative pour la préparation des étalons destinés pour une trousse de dosage de la progestérone dans le lait. Ces étalons une fois préparés, calibrés et lyophilisés, peuvent être reconstitués dans la matrice des échantillons à doser.

3.4.3 Etude de la stabilité des étalons :

La stabilité d'un lot d'étalons préparés dans du tampon phosphate en 2012, a été testée après une durée de stockage de trois années au réfrigérateur (8-10°C), sous la forme lyophilisée. Les résultats de dosage de la progestérone obtenus (**Tableau 3.11**) montrent des taux de recouvrement des concentrations de progestérone des étalons très satisfaisants, variant de 60% à 100%. La régression linéaire appliquée aux différentes concentrations de progestérone obtenues par les étalons au courant des années 2012 et 2015 donne un coefficient de détermination r^2 de 1 et une équation de régression linéaire $y= 0,9x$, il en résulte un taux de dégradation de 10% de la concentration initiale de l'étalon. La droite de régression est représentée par la **figure 3.16**.

Tableau 3.11 : Stabilité des concentrations de progestérone des étalons lyophilisés

Etalons	Concentration en progestérone des étalons (ng/ml)		Taux de recouvrement (%)
	Année 2012	Année 2015	
1	0	0,01	-
2	0,02	0,02	100
3	0,54	0,49	90,74
4	2,35	1,55	65,96
5	14,83	12,36	83,34
6	54,21	48,85	90,11

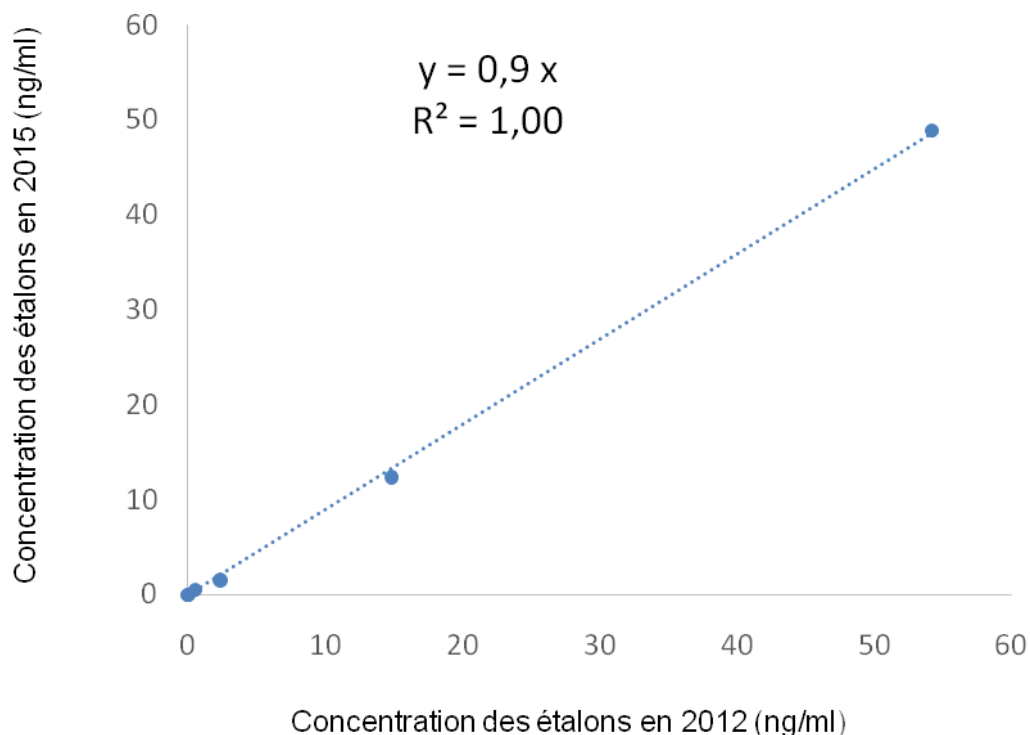


Figure 3.16 : courbe de régression linéaire correspondant à la stabilité des étalons

3.5 OPTIMISATION DU DOSAGE RIA PROGESTERONE ET EVALUATION DE LA COURBE D'ETALONNAGE :

3.5.1 Paramètres d'optimisation de la courbe d'étalonnage :

Le développement d'une technique de dosage implique inéluctablement l'optimisation des différentes étapes qui constituent le procédé de dosage RIA, cela afin de l'adapter aux conditions pratiques de son utilisation et permettre ainsi une meilleure précision et une limite de détection minimale [185]. Cette étape consiste à proposer un mode opératoire normalisé ou "Standard Operating Procedure" (SOP) [156]. Dans le cas de cette étude, trois paramètres susceptibles d'influencer la réaction antigène-anticorps et l'équilibre d'immunocompétition ont été évalués, il s'agit de la durée et de la température d'incubation de la réaction d'immunocompétition (**Tableau 3.12**) et le nombre de lavage des tubes de dosage après incubation et décantation (**Tableau 3.13**).

L'effet de la durée d'incubation de la réaction d'immunocompétition sur la liaison maximale montre des taux de Bmax qui croient de 48% à 60% pour une durée d'incubation allant de 2 à 18 heures, puis se stabilise.

Le paramètre température d'incubation de la réaction d'immunocompétition enregistre un meilleur taux de liaisons maximum pour une température d'incubation de 25°C (Température ambiante).

Quant aux taux de liaisons non spécifiques (LNS), ils restent dans toutes les conditions inférieures à la norme de 5%, admise en RIA.

Tableau 3.12 : Effet de la durée et de la température d'incubation sur la réaction d'immunocompétition

Conditions d'incubation		Bmax(%)	LNS(%)
Durée (heures) (25°C)	2	47.77±1.18	3.62±0.18
	3	53.15±0.55	2.20±0.22
	18	60.13±0.33	3.29±0.81
	24	60.71±1.35	2.65±0.77
Température (°C)	4	24.03±0.52	1.25±0.44
	25 (TA)	29.35±0.35	2.64±0.55

- L'effet du nombre de lavage des tubes de dosage après décantation représente un autre paramètre de variation des taux de liaisons spécifiques et non spécifiques. Deux lavages des tubes s'avèrent nécessaires dans le cas de la trousse développée, ceci permet de réduire les liaisons non spécifiques (LNS) à 4%, une valeur admise en RIA inférieure à 5%. La liaison maximale diminue considérablement, mais elle reste cependant satisfaisante pour le dosage.

Tableau 3.13 : Effet du nombre de lavage des tubes après décantation sur la réaction d'immunocompétition

Nombre lavage*	Bmax(%)	LNS(%)
0	70.02±4.19	25.33±7.05
1	62.66±1.48	7.38±0.99
2	60.32±3.43	4.07±0.73
3	50.56±2.94	1.82±0.88

*un lavage équivaut 500µl de solution de lavage / tube

3.5.2 Evaluation de la courbe d'étalonnage :

La **figure 3.17** présente un exemple de courbe d'étalonnage RIA de dosage de la progestérone obtenue grâce à l'utilisation de l'ensemble des réactifs de base préparés localement.

La limite de détection moyenne et les valeurs moyennes de certains paramètres liés aux courbes d'immunocompétition calculées sur une durée de 8 semaines d'essais sont consignées dans le **tableau 3.14**.

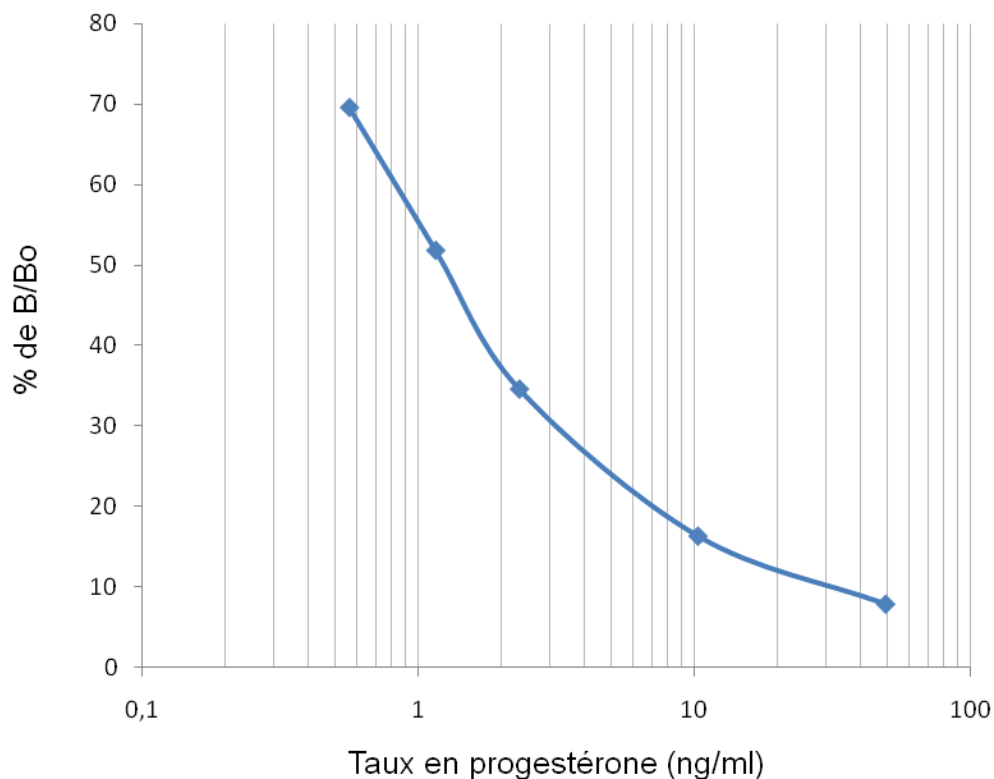


Figure 3.17 : Courbe d'étalonnage progestérone dans une matrice Lait à 50%

Sur l'ensemble des paramètres étudiés, on constate une stabilité de la liaison spécifique et non spécifique. Les paramètres liés à l'allure de la courbe et à la détection limite montrent une légère variation ($CV < 25\%$). La limite de détection moyenne obtenue ($0.14 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$) avec les différentes courbes standards sont comparables à celles rapportées dans la bibliographie [122, 123, 124, 177, 186].

Tableau 3.14 : Valeurs moyennes des paramètres de contrôle de qualité des courbes standards obtenues durant 8 semaines d'essais

Paramètres	Matrice lait
Liaison maximum (%)	37.33±4.11
Liaisons non spécifiques (%)	2.89±0.22
Valeurs en progestérone (ng/ml) à :	
- 20% B/B0	12.04±2.54
- 50% B/B0	2.11±0.69
- 80% B/B0	0.36±0.15
Limite de détection (ng/ml)	0.14±0.03

3.6 VALIDATION DE LA TROUSSE RIA PROGESTERONE/LAIT DEVELOPPEE :

Suite au développement de l'assurance qualité dans les laboratoires, la validation a pris une place importante dans le cycle de vie d'une technique d'analyse [156]. Son but est de démontrer que la méthode développée correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et correspond à un ensemble d'opérations, nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé [158].

La validation doit se faire à deux niveaux, le premier est sur le plan technique (efficacité analytique), son but est la vérification du matériels biologique et instrumental utilisé, le second est sur le plan clinique (efficacité diagnostique), le biologiste doit vérifier le pouvoir analysant de la technique utilisée.

3.6.1 Evaluation analytique de la trousse RIA Progestérone/lait développée :

3.6.1.1 Le test de précision :

Le test de précision évalué à travers les variations intra et inter- essais de trois concentrations de progestérone dans des échantillons de lait bovin (**Tableaux 3.15 et 3.16**), montrent que les basses concentrations de progestérone présentent des coefficients de variation de 13% et 12% respectivement, alors que les concentrations moyennes et élevées de progestérone présentent des coefficients de variation dans la globalité qui varient entre 5% et 9%. Ces résultats indiquent que la trousse locale de dosage de la progestérone permet une meilleure précision lorsque la concentration de progestérone dépasse le 1ng/ml. Ils sont cependant comparables aux taux rapportés par la bibliographie, qui sont respectivement inférieurs à 7-10% et inférieurs à 15% pour les intra-essais et les

intéressais [122, 124,177], mais légèrement supérieurs à la norme de 10%, pour les faibles concentrations [158,187].

La précision lors de basses concentrations est dépendante de la limite de détection du dosage, cette dernière est liée à l'affinité de l'anticorps utilisé. En effet, lors d'un dosage immunologique, il est recommandé une constante d'affinité idéalement de 10^{12} /mol, celle-ci détermine la sensibilité du dosage et atténue la susceptibilité de l'anticorps aux interférences du milieu [188]. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps issu d'un immunogène couplé à l'albumine bovine en position C11, semblable au conjugué marqué (P-11-HS) (système RIA homologue) avantage la spécificité des anticorps, mais affecte sensiblement la sensibilité du dosage [123,171].

Tableau 3.15 : Reproductibilité intra-essais de la trousse RIA locale de dosage de la progestérone.

Echantillons de lait	E1	E2	E3
Nombre de répétition	10	10	10
Valeur moyenne (ng/ml)	0.30	4.84	20.93
C.V. (%)	12.66	5.49	4.95

Tableau 3.16 : Reproductibilité intéressais de la trousse RIA locale de dosage de la progestérone.

Echantillons de lait	E1	E2	E3
Nombre de répétition	10	10	10
Valeur moyenne (ng/ml)	0.50	3.28	13.39
C.V. (%)	11.93	8.72	6.50

3.6.1.2 Le test d'exactitude :

a) Le test de dilution :

Les résultats des épreuves de dilutions enregistrés par la trousse RIA de dosage de la progestérone préparée localement sont donnés dans le **tableau 3.17**.

Les taux de recouvrement obtenus par les échantillons de lait écrémé bovin (48.85ng/ml, 7.68 ng/ml et 4.41ng/ml), dilués dans du lait écrémé bovin déplété (zéro progestérone) sont très satisfaisant. Ils varient respectivement entre 88% et 112%, 87% et 126% et entre 87% et 123%. Les résultats des valeurs minimales et

maximales de ces rendements rentrent dans la fourchette de 70-130% préconisée pour les immunodosages [158, 189].

Tableau 3.17 : Epreuve de dilution de la trousse RIA locale de dosage de la progestérone

Echantillons de lait	Dilution	Progestérone (ng/ml)		Taux de recouvrement (%)
		Mesurée	Attendue	
E1	1	48.85		-
	1:2	21.72	24.43	88.93
	1:4	10.79	12.21	88.35
	1:8	6.26	6.11	102.52
	1:16	3.26	3.05	106.78
	1:32	1.71	1.53	112.02
E2	1	7.68		-
	1:2	4.59	3.84	119.57
	1:4	2.11	1.92	109.78
	1:8	1.17	0.96	121.74
	1:16	0.61	0.48	126.09
	1:32	0.21	0.24	86.96
E3	1	4.41		-
	1:2	2.64	2.21	119.73
	1:4	1.24	1.10	112.47
	1:8	0.64	0.55	116.10
	1:16	0.34	0.28	123.36
	1:32	0.12	0.14	87.07

Les résultats du test de dilution illustrés par la **figure 3.18**, montrent une bonne linéarité des courbes de dilutions pour les trois concentrations étudiées. Les coefficients de détermination (r^2) obtenus sont de l'ordre de 0.99 et de pente équivalant presque à la concentration initiale de l'échantillon de lait. L'ordonnée à l'origine est légèrement différente de zéro (0.1-0.4ng/ml) correspondant sans doute à une légère erreur systématique de dosage [110,187].

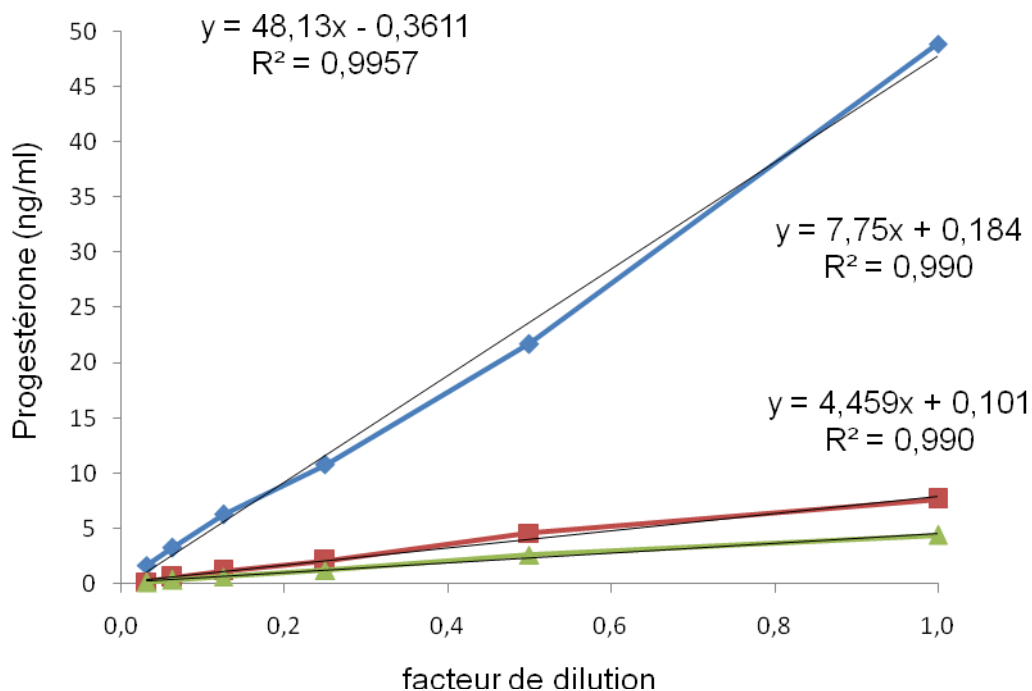


Figure 3.18 : Epreuves de dilution de la trousse RIA/Prog locale.

b) Le test de surcharge :

Les résultats des épreuves de surcharge consignés dans le **tableau 3.18** montrent des taux de recouvrement pour l'ensemble des échantillons de lait surchargés très satisfaisants. Les taux obtenus varient de 84% à 119%, ils sont compris dans la fourchette de 70-130% [158, 189]. La représentation graphique des concentrations de progestérone attendues en fonction des concentrations mesurées (**Figure 3.19**) est une droite de régression linéaire d'équation $y=0.975x + 0.03$, de pente presque égale à l'unité et l'ordonnée à l'origine est presque nulle. Le coefficient de détermination de cette droite est de l'ordre de $r^2 = 0.99$.

En routine, les résultats du test de surcharge compris entre 70 et 130 % sont considérés comme acceptables. En dessous de 70 % et au-dessus de 130%, le test de surcharge indique une interférence au niveau de la réaction d'immunocompétition et les valeurs de progestérone dosées dans les échantillons de lait sont sous (ou) surestimées.

Tableau 3.18 : Epreuve de surcharge de la trousse RIA locale de dosage de la progestérone

Echantillons de lait	Concentration (ng/ml)				Taux de recouvrement (%)
	concentrations	Ajoutée	Mesurée	Attendue	
S1	0,30	0,58	0,52	0,44	118,86
		1,15	0,84	0,72	115,71
		11,53	6,82	5,91	115,38
S2	2,46	0,58	1,56	1,52	102,63
		1,15	1,91	1,80	105,81
		11,53	7,11	6,99	101,64
S3	4,41	0,58	2,58	2,49	103,41
		1,15	2,87	2,78	103,24
		11,53	7,77	7,97	97,49
S4	4,74	0,58	2,45	2,66	92,10
		1,15	2,47	2,94	83,87
		11,53	8,13	8,14	99,94

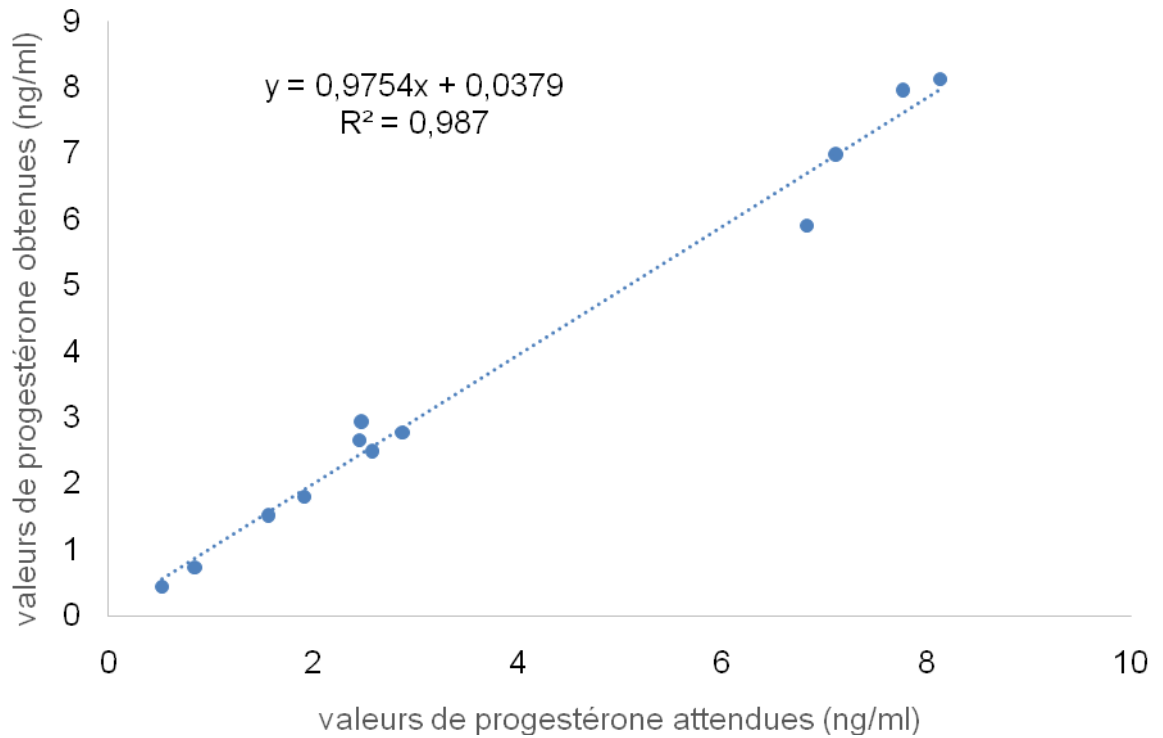


Figure 3.19 : Epreuves de surcharge de la trousse RIA/Progestérone locale

3.6.2 Evaluation clinique de la trousse progestérone/lait développée :

Les courbes d'étalonnage progestérone Immunotech et locale qui ont permis la lecture des valeurs de progestérone des échantillons de lait écrémés inconnus, prélevées dans le cadre de cette étude d'évaluation clinique, sont représentées par la **figure 3.20**.

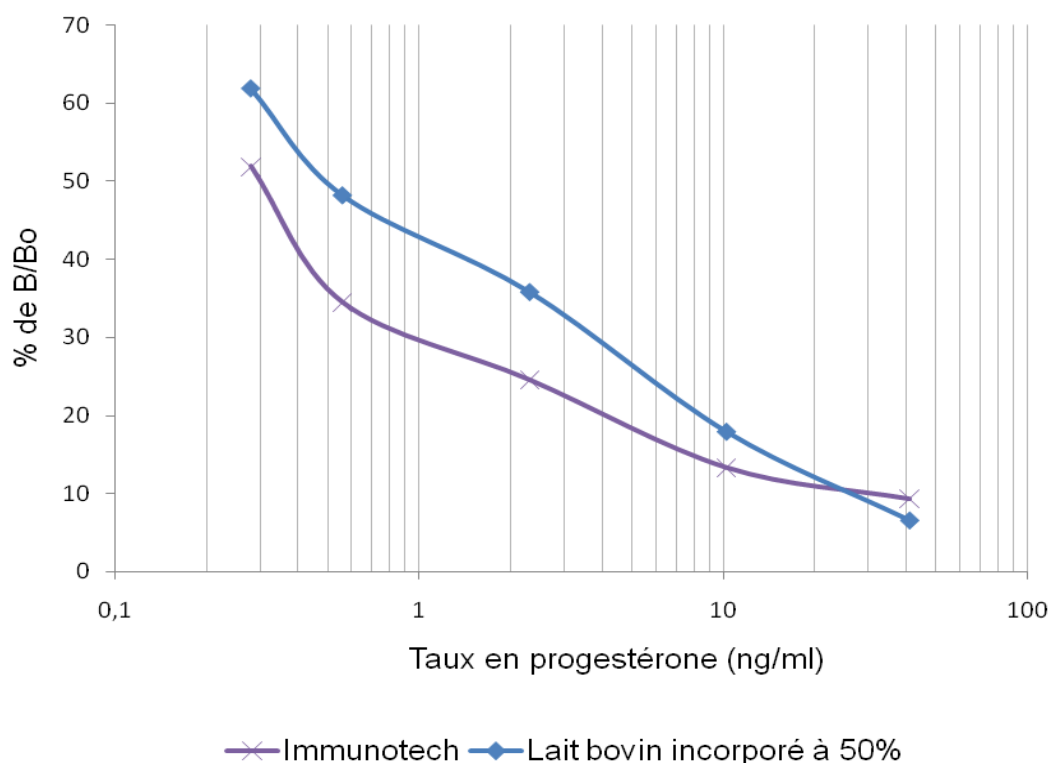


Figure 3.20 : Courbe d'étalonnage progestérone dans une matrice Lait (trousse Immunotech et locale)

Les résultats de l'évaluation clinique réalisée à travers le dosage radioimmunologique de la progestérone d'une trentaine d'échantillons de lait prélevés sur des vaches à différents stades physiologiques, sont illustrés par la **figure 3.21**. Les détails de ces résultats sont présentés au niveau de l'annexe 4.

L'analyse de régression linéaire a révélé une très bonne corrélation entre les valeurs de progestérone obtenues par le dosage RIA réalisés avec la trousse commerciale et celle préparée localement ($r = 0.998$). L'équation de la courbe de régression linéaire qui lie ces deux variables est sous la forme : $y = 0.9x + 0.09$, avec une pente qui équivaut presque l'unité. Le coefficient de détermination " r^2 " est de 0.997. Cette relation laisse apparaître une légère sous-estimation (environ 10%) des concentrations de progestérone dosées par la trousse locale par rapport à celles dosées par la trousse Immunotech.

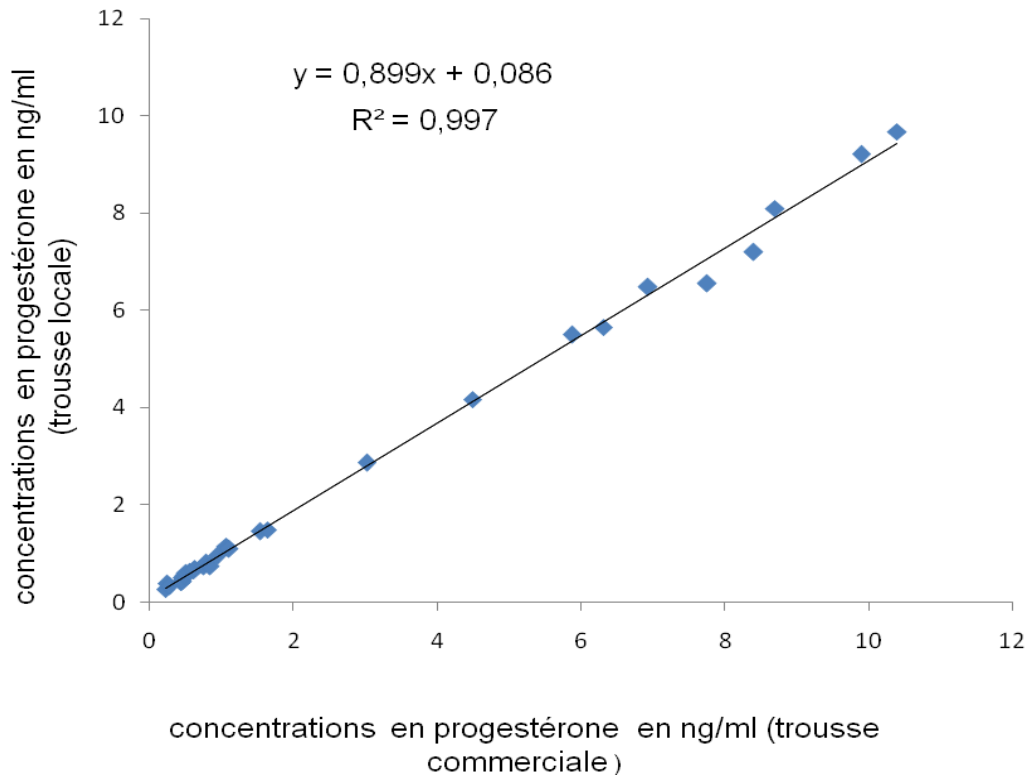


Figure 3.21 : courbe de régression linéaire des taux de progestérone dosés dans les échantillons de lait de vaches au moyen d'une trousse locale et commerciale

Par ailleurs, les taux de recouvrements obtenus pour ces mêmes échantillons par rapport aux valeurs de référence (70-130%) sont représentés par la **figure 3.22**. Ils varient en général de 84% à 125%, avec une moyenne de $101.07 \pm 11.55\%$. Selon le stade physiologique des vaches, le taux de recouvrement enregistré est en moyenne de $107.82 \pm 11.26\%$ et $93.37 \pm 5.59\%$ respectivement pour des concentrations en progestérone inférieures (<) et supérieures (>) à 1ng/ml.

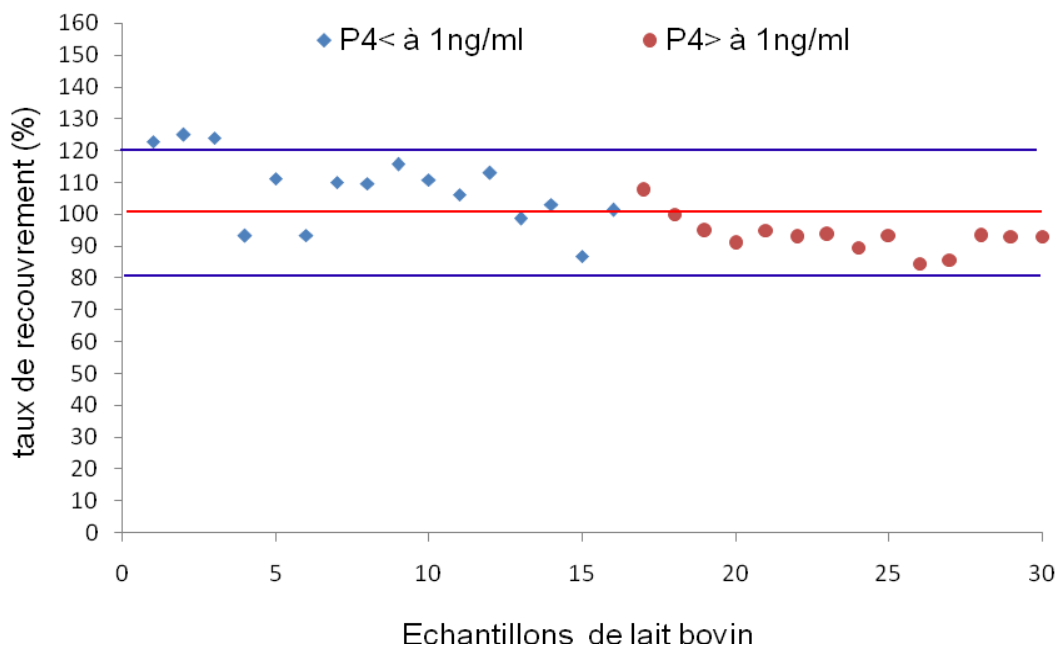


Figure 3.22 : Représentation des taux de recouvrement des concentrations de progestérone dosées par la trousse locale et Immunotech.

3.7 ESTIMATION APPROXIMATIVE DU COUT DE PRODUCTION D'UNE TROUSSE DE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE LA PROGESTERONE

Le développement au niveau local d'une trousse de radioimmunodosage (RIA) de la progestérone chez les bovins présente, outre sa disponibilité locale, un intérêt économique qui se traduit par la réduction de son coût de revient par rapport au prix d'achat d'une trousse commerciale importée pour le même objectif d'analyse de la progestérone chez la vache laitière.

A titre indicatif, le coût (prix d'acquisition) d'une trousse de marque «Beckman Coulter » importée en 2015 pour le radioimmunodosage (RIA) de la progestérone chez la vache est estimé, selon le fournisseur local public, à 12 000 DA pour une quarantaine (40) de tests (**Tableau 3.19**). A la même année, le coût d'une trousse développée localement pour la réalisation du même nombre de tests avec cependant, des réactifs importés, revient à environ 7000 DA (tableau 3.24). Dans cette estimation, il est tenu compte seulement des éléments suivants de la trousse :

- la progestérone 11 α Hemisuccinate ;
- les anticorps ;
- les tubes Maxisorp de type Nunc
- l'iode 125.

Les anticorps représentent environ **75,8 %** du prix estimé de la trousse. D'où le grand intérêt de produire localement un antisérum polyclonal spécifique à la progestérone.

Tableau 3.19. Estimation approximative du coût en DA du développement d'une trousse RIA progestérone pour les besoins de l'élevage algérien en 2015

Principaux constituants d'une trousse	Trousse locale (1)		Trousse commerciale importée (2)	Différence de coûts (1) - (2)
	Coût des composants (DA)	%	Coût (DA)	
Iode 125	100,00	1,51	-	-
Progestérone HS + histamine	30,00	0,45	-	-
Anticorps	5 031,00	75,80	-	-
Tubes Maxisorp de type Nunc	1 476,00	22,24	-	-
Total (DA)	6 637,00	100,00	12 000,00	- 5 363,00

Les coûts sont estimés sur la base d'un taux de change de 1€ = 115 DA (2015)

L'estimation approximative du coût de développement d'une trousse RIA localement indique qu'il est possible de réaliser une économie de l'ordre de 5363 DA par trousse RIA ; soit une réduction de 44,7% du coût d'importation d'une trousse similaire.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Parmi les moyens de diagnostic de la reproduction des troupeaux, le dosage de la progestérone par la technique RIA (radio-immunoassay) ou radioimmunologie est utilisé pour caractériser les profils progestéronémiques avec précision et d'affirmer les connaissances dans le domaine de la physiologie de la reproduction animale. La maîtrise de cette technique permet de contribuer à mieux gérer les performances de reproductions des troupeaux. En effet, l'obtention d'une bonne fertilité dans un élevage bovin est un indicateur de la possibilité pour un animal à réaliser une gestation avec une ou deux inséminations seulement. Son amélioration demeure un des objectifs prioritaires de tout éleveur pour optimiser le potentiel de reproduction et de production de son élevage. En outre, cela lui permet de pallier aux pertes engendrées par l'absence de fécondation, la mortalité embryonnaire précoce et toutes autres défaillances de la fonction de reproduction.

Ce travail de thèse a été axé sur le développement d'une trousse radioimmunologique (RIA) en phase solide permettant le dosage direct et fiable de la progestérone dans le lait bovin. Il a consisté en la préparation et la caractérisation des trois (03) réactifs de base qui composent la trousse : i) **le traceur** (analogue à la progestérone : progestérone 11 α Hemisuccinate, marqué à l'iode¹²⁵) ; ii) **la phase solide** (anticorps spécifiques à la progestérone et au traceur, coatés sur la paroi interne des tubes) ; iii) **la gamme étalon progestérone**. Ces trois réactifs utilisés ensemble, permettent d'obtenir un système sensible, reproductible et spécifique pour le dosage de la progestérone.

Les caractéristiques des trois composants de la trousse mise au point dans cette expérimentation sont résumées comme suit :

i) Le traceur. L'un des réactifs de base de la trousse de dosage radioimmunologique (RIA de type compétition) de la progestérone est le traceur radioactif. Celui-ci doit avoir une activité spécifique adéquate, une pureté radiochimique et une immunoréactivité élevées ainsi qu'une bonne stabilité au cours du temps.

Dans le cas de la progestérone qui est haptène stéroïdien, sa structure chimique étant dépourvue de résidus tyrosyls, capables d'incorporer un atome d'iode radioactif, un bras (histamine) préalablement marqué à l'iode-125, lui est conjugué, c'est le marquage indirect. Le rendement de marquage de l'histamine de 71% est considéré comme très satisfaisant.

Après une étape d'extraction à l'éthyle acétate et une purification sur colonne remplie de gel sephadex G-25, l'évaluation des deux traceurs obtenus (progestérone 11 α HS-mono et diiodo-histamine) a montré qu'ils sont de bonne qualité en termes de pureté radiochimique, d'immuno-réactivité spécifique et non spécifique (la moyenne est de 98%, 40% et 3% respectivement). Quant à l'étude de stabilité, elle a montré que le traceur progestérone 11 α HS-monoiodo-¹²⁵Ihistamine, stocké à 10°C ou à -6°C conserve ses performances pendant une durée de 3 mois. En effet, le

marquage avec de faibles activités (357 μ Ci) favorise la stabilité du traceur en réduisant les phénomènes de radiolyse ; mais affecte négativement l'activité spécifique et volumique du traceur obtenu (7 μ Ci/ μ g et 9 μ Ci/ml respectivement), qui se répercute sur la sensibilité du dosage développé.

ii) Le système phase solide (anticorps). Le second composant qui constitue la trousse est l'anticorps. Un volet production d'antisérums polyclonaux anti progestérone 11 α -hemisuccinate-BSA a été intégré dans le projet, en vue d'une utilisation comme réactif de base dans préparation de phase solide. Cependant, les antisérums produits chez les deux (02) lapins immunisés, ne présentaient pas les performances requises (titre et spécificité) pour permettre un dosage radioimmunologique performant d'un point de vue précision et sensibilité. Quant à la préparation de la phase solide de la trousse, elle a pu être réalisée et optimisée grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal fournis par le commerce. La comparaison des différents systèmes de séparation des formes libres et liées étudiés a montré l'efficacité du système phase solide comparé aux systèmes de séparation par précipitation. Aussi, il permet la conservation des propriétés immunologiques des tubes coatés pendant une durée de stockage de 12 mois au réfrigérateur (10°C). Le taux d'immunoréactivité moyen enregistré au cours de cette durée de stockage est de 43.60 \pm 5.12%, avec un coefficient de variation de l'ordre de 12%.

iii) La gamme étalon. Le troisième composant de la trousse RIA est la gamme d'étalonnage. En l'absence d'une trousse commerciale RIA de dosage de la progestérone, validée pour le lait bovin et compte tenu des interférences relatives à l'effet matrice, existantes lors d'un immunodosage, trois (03) matrices (tampon phosphate à 100%, lait incorporé à 50% et lait incorporé à 100%) ont été utilisées pour la préparation des étalons. Ces derniers ont été calibrés par dosage RIA de la progestérone utilisant la trousse Immunotech sérum humain (IM1188). Les résultats de dosage des étalons progestérone, reconstitués dans les différentes matrices étudiées, montrent d'une part, des valeurs en progestérone des étalons préparés dans une matrice tampon phosphate (zéro lait), très fortement corrélées ($r=0.999$) aux valeurs des concentrations attendues et d'autre part, une hausse des concentrations de progestérone dans les étalons lait écrémé, à mesure que le taux d'incorporation du lait bovin dans la matrice des standards est augmenté à 50% et à 100%. Par conséquent, ces résultats permettent de déduire que la trousse commerciale RIA Immunotech de dosage de la progestérone validée pour le sérum humain ne peut à aucun cas servir d'étalon secondaire pour la calibration des étalons progestérone préparés dans une matrice lait bovin déplété (zéro progestérone). A défaut d'une calibration par une trousse commerciale, validée pour le dosage de la progestérone dans le lait bovin, ou par l'usage d'une technique connexe, telle que la CG-MS, l'utilisation de la matrice tampon phosphate pour la

préparation des étalons et la calibration de ces derniers par une trousse commerciale validée pour le sérum, constitue une excellente alternative pour la préparation des étalons la trousse locale. Ces étalons, une fois préparés et calibrés, ils sont lyophilisés et ils peuvent être reconstitués dans la matrice de travail étudiée. Par ailleurs, d'un point de vue de la stabilité, ces étalons une fois préparés, calibrés, lyophilisés et stockés au réfrigérateur pendant une durée de trois (3) années, ils enregistrent un taux de dégradation de 10% par rapport à la concentration initiale.

- **Optimisation des conditions de dosage.** Une fois la trousse expérimentale constituée, des séries de tests RIA ont permis d'optimiser certaines conditions de dosage (mode opératoire). Celle-ci a montré qu'une durée d'incubation de la réaction d'immuno-compétition de deux (2) heures à une température ambiante (25°C) sont idéales et suffisantes pour atteindre l'équilibre de la réaction et que deux (2) lavages des tubes, à 500µl avec un tampon de lavage étaient nécessaires pour réduire le taux de liaisons non spécifiques à la norme autorisée (<5%). Quant aux résultats d'évaluation des courbes d'étalonnage obtenues, ils montrent une stabilité de la liaison spécifique (37.33±4.11%) et non spécifique (2.89±0.22%) et une bonne sensibilité du dosage (limite de détection moyenne de 0.14±0.03ng/ml). La plage des mesures de la courbe d'étalonnage commence de la valeur de la sensibilité analytique à l'étalon le plus élevé.
- **Validation de la trousse développée.** L'étape finale du cycle de vie d'une technique précédant son utilisation en routine est sa validation d'une part, sur le plan analytique, afin de tester l'efficacité des instruments de mesure et des réactifs utilisés et préparés et d'autre part, sur le plan clinique, afin de vérifier l'efficacité diagnostique. Le test de précision évalué à travers les variations intra et inter- essais de trois concentrations de progestérone d'échantillons de lait bovin, enregistrent des coefficients de variation respectivement de 13% et 12% pour les basses concentrations et varient entre 5% et 9% pour les concentrations de progestérone moyennes et élevées. Ces résultats indiquent, que la trousse locale mise au point pour le dosage de la progestérone dans des échantillons de lait bovin permet une meilleure précision lorsque la concentration en progestérone dépasse le 1ng/ml. Quant à l'évaluation de l'exactitude du dosage, mesurant le degré de rapprochement du résultat obtenu de la valeur exacte de l'échantillon dosé, elle est révélée par le test de dilution dans du lait écrémé bovin déplété (zéro progestérone), d'échantillons de lait écrémé bovin de concentration élevée et par le test de surcharge d'échantillons de lait écrémé bovin, avec des quantités connues de progestérone. Le premier permet d'apprécier la proportionnalité des valeurs estimées par la méthode de dosage considérée aux valeurs vraies et le second vérifie que l'analyte mesuré est dosé en totalité dans le milieu réactionnel. Les pourcentages de recouvrement enregistrés s'échelonnent respectivement entre 86.9% et

126% et entre 83.8% et 118.5%. Sur le plan clinique, la comparaison par analyse de régression des résultats de dosage de la progestérone, d'un lot (30) d'échantillons de lait collecté sur des vaches à différents stades physiologiques, dosés simultanément avec la trousse locale développée et la trousse commerciale Immunotech adaptée au dosage de la progestérone dans le lait bovin selon la méthode de Lupi-Chen et al 1999 [150], montrent une très bonne corrélation ($r= 0.998$) entre les deux trousse.

En termes de perspectives, la trousse de radioimmunos dosage (RIA) de la progestérone mise au point localement mérite d'être vulgariser pour la généralisation de son usage au niveau du secteur de l'élevage et au niveau des laboratoires universitaires. Une telle initiative passe par la mise à la disposition des utilisateurs de cet outil de diagnostic moderne qui permettra d'apporter plus de précision dans la gestion de la fonction de reproduction des troupeaux de production et également des troupeaux d'expérimentation pour les besoins de travaux de recherche.

Il est donc primordial d'acquérir une autonomie en ce qui concerne les réactifs de radioimmunos dosage, en contribuant à assurer une disponibilité locale de ces trousse (progestérone ou autres analytes). Il s'agit de permettre un approvisionnement suffisant en ces trousse sur le territoire national. D'autant plus que la conjoncture internationale actuelle rend difficile l'acquisition de trousse de l'étranger (réduction des ressources en devise, lenteur d'acheminement de produits sensibles et périssables, lourdeur des formalités douanières et conditions strictes de stockage). De telles restrictions entraînent une baisse dans la qualité des analyses, à travers des utilisateurs qui cherchent à tirer un profit maximum de ces trousse et négligent la nécessité et l'intérêt d'appliquer les procédures normalisées d'analyses (dosages en double) et le contrôle de la qualité.

Enfin, il est judicieux, dans cette optique de poursuivre de tels travaux de recherche pour développer localement les différents réactifs de base qui composent la trousse de radioimmunos dosage :

- Il s'agit pour la composante « traceur » de développer les conjugués progestérone 11- α -hemisuccinate et progestérone 11- α -hemisuccinate-histamine. Ce dernier servira à développer le marquage direct de ce stéroïde et à éliminer les trois étapes de préparation du traceur (activation, conjugaison et extraction) par marquage indirect.
- Pour la partie phase solide, il est essentiel de développer localement la production d'un anticorps polyclonal plus spécifique et de forte affinité pour la progestérone. Ce dernier servira à préparer la phase solide de la trousse RIA de radioimmunos dosage de la progestérone dans la matrice lait, à améliorer la sensibilité du dosage et à d'adapter aussi cette trousse à une matrice sérique bovine et à d'autres espèces.

ANNEXES

Annexe 1

Préparation des réactifs

- **Le tampon phosphate** (500ml) : tampon phosphate à 0.5M (pH 7.4) est constitué de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11.70g) et Na_2HPO_4 (24.84g). Le pH est ajusté à 7.4.
- **Le tampon d'éluion** est constitué du tampon phosphate : 0,1 M, pH 7,4 enrichi de BSA (bovine sérum albumine) à 1% et d'azide de sodium (NaN_3) à 0.1%.
- **un tampon de travail** (100ml) est constitué du tampon phosphate : 0,05 M, pH 7,4 enrichi de gélatine 0.2% et d'azide de sodium (NaN_3) à 0.1%.
- **La solution de lavage** : tampon phosphate : 0,05 M, pH 7,4 contenant 0,1 % (v / v) de Tween 20
- **Le tampon de fixation** est un tampon carbonate (0.05M/ pH 9.6). : Pour 100ml de tampon : 0.159g Na_2CO_3 , 0.294g NaHCO_3 et 0.1% NaN_3 . Le pH est ajusté à 9.6.
- **Le tampon de saturation** est un tampon phosphate (0.05M/ pH 7.4), enrichie de gélatine 1%, de sucrose à 1% et d'azide de sodium (NaN_3) à 0.1%.
- **Le KI** (potassium iodide) : 10mg/ml
- **Le Polyéthylène Glycol** (PEG) : 25%,
- **La bovin gamma globuline** : 15 mg/ml
- **Azide de sodium NaN_3 à 0.1%** : 0.1g/100ml

Annexe 2

- Les profils d'évaluation de la pureté radiochimiques des extraits 1 et 3, illustrés par la **figure 3.39**.

		Pureté radiochimique des extraits 1 et 3							
		Extrait 1			Extrait 3				
1	9855	86471	95,9456311	1	149021	14902,1	17244,3	3,31865905	
2	73039	3654		2	18698	1869,8	502372,2		
3	3577	90125		3	4724	472,4	519616,5		
4	2759			4	2950	295			
5	2621			5	2204	220,4			
6	1980			6	2879	287,9			
7	1802			7	4188	418,8			
8	1911			8	1427	142,7			
9	2240			9	1013	101,3			
10	2209			10	809	80,9			
11	1543			11	3542	354,2			
12	3334			12	1569	156,9			
13	1096			13	3446	344,6			
14	462			14	189496	18949,6			
15	1300			15	4043230	404323			
16	2043			16	790996	79099,6			
17	311			17	8335	833,5			
18	45			18	314	31,4			
19	95			19	636	63,6			
20	723			20	5911	591,1			

Annexe 3

- Les résultats d'évaluation des pics 1, 2 et 3 de l'extrait 2, présentés dans le **tableau 3.8.**

PRC du 03/03/2010											
Pureté radiochimique des Pics 1,2 et 3 de l'extrait 2											
Pic "a"				Pic "b"				Pic "c"			
1	26137	142161	97,923885	1	2202	57587	98,6991396	1	33361	96200	98,5958799
2	80338	3014		2	46900	759		2	40739	1370	
3	35686	145175		3	8485	58346		3	22100	97570	
4	4059			4	247			4	5546		
5	1883			5	379			5	3403		
6	1725			6	200			6	3215		
7	1175			7	299			7	2686		
8	722			8	104			8	2230		
9	174			9	211			9	1273		
10	446			10	134			10	1822		
11	608			11	140			11	792		
12	1470			12	191			12	534		
13	936			13	104			13	719		
14	726			14	330			14	413		
15	643			15	176			15	252		
16	386			16	410			16	855		
17	340			17	173			17	263		
18	294			18	181			18	235		
19	259			19	127			19	175		
20	146			20	110			20	188		

Annexe 4

- Les résultats de l'évaluation clinique réalisée à travers le dosage radioimmunologique de la progestérone d'une trentaine d'échantillons de lait prélevés sur des vaches à différents stades physiologiques, illustrés par les figures 3.56 et 3.57.

Echantillons	Evaluation Clinique		Recouvrement
	RIA Immunotech	RIA local	
1	0,22	0,27	122,73
2	0,24	0,37	125,00
3	0,27	0,33	123,93
4	0,44	0,41	93,18
5	0,45	0,50	111,23
6	0,46	0,43	93,48
7	0,48	0,53	110,04
8	0,49	0,54	109,68
9	0,51	0,59	115,69
10	0,55	0,61	110,91
11	0,61	0,65	106,24
12	0,62	0,70	112,90
13	0,75	0,74	98,67
14	0,78	0,80	103,18
15	0,84	0,73	86,90
16	0,94	0,95	101,31
17	1,07	1,15	107,48
18	1,10	1,10	99,98
19	1,53	1,45	94,77
20	1,64	1,49	90,85
21	3,02	2,87	95,03
22	4,49	4,17	92,87
23	5,87	5,50	93,65
24	6,31	5,65	89,54
25	6,93	6,47	93,43
26	7,75	6,55	84,52
27	8,40	7,20	85,71
28	8,69	8,10	93,18
29	9,89	9,20	93,06
30	10,39	9,67	93,07

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

- Ac** : anticorps
Ag : antigènes
Ag* : Antigène marqué
Ag*-Ac : Complexe Anticorps –Antigènes marqué
Ag-Ac : Complexe Anticorps –Antigènes froid
AS : Activité Spécifique
AIEA : Agence Internationale d’Energie Atomique
- B0** : binding = taux de liaisons obtenu avec le standard zéro antigène froid
BYG : bovin gamma globuline
BSA : bovine sérum albumine
- O=C** : Fonction cétone
C : Carbone
C° : Degré Celsius
CBG : cortico binding globuline = Transcortine
CJ : Corps Jaune
CLIA : Chemie luminéscence
cm : centimetre
COCH₃ : Groupement acétyle
CPM : coups par minute
CV : coefficient de variation
CDTN : Centre de Développement des Techniques Nucléaires
CNIAAG : Centre National d’Insémination Artificielle et d’Amélioration Génétique
- EDTA** : Ethylène Diamine Tétra Acétique Acide
EIA : EnzymoImmunoAssay
FIA : FluoroImmunoAssay
FSH : Follicule Stimulating Hormone
- g** : gramme
GC : gas Chromatograpy
GC/MS : Gas Chromatography Mass Spectromet
GnRH : Gonadotropin Reasing Hormone
- HCl** : acide chloridrique
HPLC : High performance liquid Chromatography
HS : hemisuccinate
HSD : hydroxy tetra dehydrogenase

I : Iode
i-Bu : Isobutyle chloroformate
Ig : Immunoglobuline
IGF1 : insulin – Like Growth Factor 1
IgG : Immunoglobulines G
IgM : Immunoglobulines M
INMV : Institut National de Médecine Vétérinaire
ITELV : Institut Technique d’Elevage

KcalM⁻¹ : Kilocalories/mole
Keq : Constante d’équilibre
Kg : kilogramme
KI : iodure de potassium

LC/MS : Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LDL : Low density lipoprotéine
LH : Luteinising hormone
Ln : Logarithme népérien
LNS : Liaison non Spécifique
log : Logarithme décimal
Logit : fonction mathématique utilisée principalement

M : mole
Moy : moyenne
mg : milligramme
ml : millilitre
Mmol : millimole
mn : minute
MW : poids moléculaire

n : nombre d’échantillons
NaCl : chlorure de sodium
NaI¹²⁵ : Iodure de sodium
NaOH : hydroxyde de sodium
NMM : N-N 4-méthylmorpholine

P = P4 : progestérone
PEG : Poly Ethylène Glycol
PGF_{2α} : Acide Gras Prostaglandin
PHS : progestérone-Hemisuccinate

RC : réactions croisées
Rdt : rendement
Rf : facteur de rétention
RIA : RadiolImmunoAssay

S : écart-type

T ou Tc = total compte
TBq/mmol : Térabéquerl par millimole
TP : tampon phosphate

V : volt
V/V : volume / volume

α: Alpha

ε : épsilon

μCi : microcurie
μg : microgramme
μl : microlitre

11-DCS : 11- déoxycorticostérone
5α PD : 5 α pregnane 3,20 dione.

Références Bibliographiques

- 01. Soukehal, A.**, "Dossier filière lait : Comment atteindre l'autosuffisance en 10 ans !" Revue Perspectives N9-3eme trimestre 2013. Pp : 23- 29. [http:// www. Pixal communication.com/perspectives/revue/n9. pdf](http://www.Pixalcommunication.com/perspectives/revue/n9.pdf).
- 02. Bekhouche-Guendouz, N.**, "Evaluation de la Durabilité des Exploitations Bovines Laitières des Bassins de la Mitidja et d'Annaba." Thèse de Doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger (ENSA). Algerie. (2011) 49, 58.
- 03. Meribai, A., Ouarkoub, M., Bensoltane, A.**, "Algerian dairy sector analysis: deficit aspects and perspectives" Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, 35(7), (2016) 1986-1992
- 04. Ghozlane, F., Belkheir, B., Yakhlef, H.**, "Impact du Fonds National de Régulation et de Développement Agricole sur la durabilité du bovin laitier dans la wilaya de Tizi Ouzou(Algérie)". New Medit. 3. (2010) 22-27.
- 05. CNIS.** "Statistiques du commerce extérieur de l'Algérie" Centre National de l'Informatique et des Statistiques, Ministère des Finances, Direction Générale des Douanes 2016
- 06. Benyoucef, M.T., Omari, C., Amiali, M., Berkani, M.L., Kaci, F., Benjema O.**, "Formation universitaire en agronomie et introduction d'innovations techniques dans l'agro-industrie. Cas de la filière lait cru en Algérie." Communication in "Les systèmes d'innovation et le nouveau rôle des universités" (COSINUS). ENP Oran, Algérie 14-16 Décembre 2013
- 07. Benyoucef, M.T., et Abdelmoutaleb, M.**, "*Indicateurs de la technicité des éleveurs et canaux de vulgarisation dans des élevages bovins laitiers de la région centre (Algérie)*" Revue Sciences & Technologie de l'Université Mentouri; Constantine (Algérie) 2010.
- 08. Miroud, K., Hadeif, A., Khelef, D., Ismail, S., Kaidi, R.**, " Bilan de reproduction de la vache laitière dans le Nord-Est de l'Algérie." Livestock Research for Rural Development 26 (6) 2014
- 09. Saidi, R., Khelef, D., Kaidi, R.**, "Analyse descriptive des résultats d'insemination artificielle bovine en Algerie: Cas de la région centre" Livestock Research for Rural Development 24 (10) 2012.
- 10. Zineddine, E., Bendahmane, M., Khaled, M.B.**, " Performances de reproduction des vaches laitières recourant à l'insémination artificielle au niveau de l'institut technique des élevages Lamtar dans l'Ouest Algérien." Livestock Research for Rural Development 22 (11) 2010.

- 11. Bouzebda, Z., Bouzebda-Afri, F., Guelatti, M. A., Meharzi, M. N.,** "Enquête sur la gestion de la reproduction dans des élevages laitiers bovins de l'Est Algérien." Sciences & Technologie C – N°27, juin (2008), pp.29-36.
- 12. Yalow, R. et Berson, S.,** "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological method", Nature, (1959) 1648-1649.
- 13. Taieb, J. et Lachgar-Keltoum, M.,** "Profils Immuno-Analytiques en Biologie Médicale. La progestérone : caractéristiques immunoanalytiques", Immuno-analyse et biologie spécialisée (2011) 26, 182-189.
- 14. Wood, P.J. et Gower, D.B.,** "Analysis of Progestagens", Chapitre 7 in Steroid Analysis, H.L.J. Makin and D.B. Gower (eds.), 2010, 559-603. DOI 10.1023/b135931_7, © Springer Science + Business Media B.V.
- 15. Gonzalès, J.,** "Initiation à l'histoire de la médecine et des idées médicales : comprendre pour mieux savoir", 2^{ème} édition des éditions Heures de France 2005, ISBN : 2-85385-270-9)
- 16. Edqvist, L.E.,** "The hormones of reproduction", In: KING G.J., world animal science vol. B9: reproduction in domesticated animals, Amsterdam: ELSEVIER, 1993, 55-74.
- 17. Gabeur, B.,** "La progestérone et les progestagènes chez la jument : utilisation des dispositifs intravaginaux", Thèse Méd. Vét., Alfort, n°113, 1989, 91p.
- 18. Blanchard, S.,** "l'insuffisance luteale chez les femelles domestiques et la femme. Thèse de la faculté de Médecine de Creteil", École Nationale Veterinaire D'alfort, (2006) 130p.
- 19. Payne, A.H. et Hales, D.B.,** "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones", Endocr Rev, 25, 6, (Dec 2004) 947-970.
- 20. Bayard, F.,** "Régulation physiologique et pharmacologique des récepteurs stéroïdiens sexuels dans l'endomètre", 4-5, Vol 42, (Oct-Nov 1981) 321-6
- 21. Borel, J.P., Randoux, A., Maquart, F.X., Gillery, P., Le Peuch, Ch., Bellon, G. et Monboisse, J.C.,** "Biochimie dynamique", De Boeck & Larcier s.a., 1997 Paris, Bruxelles, ISBN 2-8041-2453-3)
- 22. Massé-Laroche, E.,** "Analyse du rôle de la LH endogène dans les variations de la progestérone plasmatique au cours des stimulations ovariennes", Université Paris Descartes (Paris 5) Faculté de Médecine, thèse 2010, 56p

- 23. Edward, R. P.**, "Immunoassay: An Introduction" William Heinmann Medical Books. London (1985)
- 24. Meredith, M.J.**, "Animal breeding and infertility - UK", Blackwell Science, 1995, 508 p.
- 25. Drion, P.V., Beckers, J-F., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J-Y., Lonergan, P.**, "Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogénèse et atresie", *Le Point Veterinaire*, vol. 28, numéro spécial "Reproduction des ruminants" 1996
- 26. Sahmi, F.**, "La regulation du gene CYP19A1 dans les cellules de granulosa bovine in-vitro", Thèse PhD de la faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. (2013) 188p.
- 27. Chastant Maillard, S.**, «Maîtriser la reproduction bovine, guide pratique", Intervet, Beaucauzé, (2010) 38p.
- 28. Monniaux, D., Caraty, A., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., Uzbekova, S.**, "Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères", *Inra Prod. Anim.*, 22 (2), (2009) 59-76.
- 29. Peters, A.R. et Ball, P.J.H.**, "Reproduction in cattle", second edition – UK: Blackwell Science (1995) 234 p.
- 30. Gayrard, V.**, "Physiologie de la reproduction des mammifères", Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse Septembre 2007, 198p
- 31. Thimonier, J.**, "Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone", *INRA Prod. Anim.*, 2000, 13 (3), 177-183
- 32. Gröschl, M.**, "Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire", *Ann Biol Clin*, vol. 67, n o 5, septembre-octobre 2009, 493-504.
- 33. Rabiee, A.R., Macmillan, K.L., Schwarzenberger, F.**, "Plasma, milk and faecal progesterone concentrations during the oestrous cycle of lactating dairy cows with different milk yields", *Animal Reproduction Science* 74 (2002) 121–131
- 34. Lu, Yu.C., Chatterton, R.T.Jr., Vogelsong, K.M., May, L.K.**, "Direct Radioimmunoassay of progesterone in saliva", *Journal of Immunoassay*, 18(2), 149-163 (1997)

- 35. Barbry, Jb., Velek, K., Pun, S., Rice, A., Egli, C., Leterme, S. et Commun, L.**, "Diagnostic précoce de la gestation chez le bovin : un nouveau test à réaliser sur le sang ou le lait. Early cow pregnancy detection: a new test used on blood or milk" *Renc. Rech. Ruminants*, 2012, 19
- 36. Banu, T.A., Shamsuddin, M., Bhattacharjee, J., Islam, M.F., Khan, S. et Ahmed, J.U.**, "Milk progesterone enzyme-linked immunosorbent assay as a tool to investigate ovarian cyclicity of water buffaloes in relation to body condition score and milk production", *Veterinaria Scandinavica* 2012, 54:30
- 37. Ergene, O.**, "Progesterone concentration and pregnancy rates of repeat breeder cows following postinsemination PRID and GnRH treatments", *Turk.J.Vet.Anim.Sci.*36:3 (2012) 283-288.
- 38. Mmbengwa, V.M., Gundidza, B.M., Greyling, J.P.C., Fair, M.D., Schwalbach, L.M.J., Du Toit, J.E.J. et Samie, A.**, "Serum progesterone as an indicator of cyclic activity in post-partum goat does", *South African Journal of Animal Science* 39 Supplement 1 (2009) 306-
- 39. Petersson, K.J.**, "Milk progesterone as a tool to improve fertility in dairy cows", *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*. Doctoral dissertation, 2007, 42, ISSN 1652-6880, ISBN 978-91-576-7345-9
- 40. Shamsuddin, M., Bhuiyan, M.M.U., Chanda, P.K., Alam, M.G.S., Galloway, D.**, "Radioimmunoassay of milk progesterone as a tool for fertility control in smallholder dairy farms", *Trop Anim Health Prod* **38** (2006) 85–92
- 41. Hommeida, A., Nakao, T., Kubota, H.**, "Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination", *Theriogenology* 62 (2004) 217-225.
- 42. Meisterling, E.M., Dailey, R.A.**, "Use of concentrations of progesterone and estradiol-17beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows", *J. Dairy Sci.* 70 (1987) 2154–2161.
- 43. Dobson, H. et Fitzpatrick, R.J.**, "Clinical application of progesterone in milk test", *Br. Vet. J.* 132, (1976), 538-542.
- 44. Waldmann, A., Ropstad, E., Landsverk, K., Sørensen, K., Sølverød, L. et Dahl, E.**, "Level and distribution of progesterone in bovine milk in relation to storage in the mammary gland", *Animal Reproduction Science* 56_1999.79–91
- 45. Ginther, O.J., Nuti, L.C., Garcia, M.C., Wentworth, B.C., Tyler, W.J.**, "Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products", *Journal of Animal Science* 42, 1976, 155–159.

- 46. Allen, S.E. et Foote, R.H.**, "An enzyme linked immunoassay of milk progesterone as a diagnostic aid in diagnostic aid in embryo transfer programs", *Theriogenology* Avril 1988 vol.29 No.4 893-903
- 47. Meurant, G.**, "Handbook of milk composition", Food Science and Technology. Ed: Academic Press (1995) ISBN: 0080533116.
- 48. Eissa, H.M., Nachreiner, R.F., Refsal, K.R.**, "Effects of sample handling temperatures on bovine skim milk progesterone concentrations", *Theriogenology* 43 (1995) 893-898.
- 49. Nachreiner, R.F., Oschmann, S.J., Edquist, L.E., Richards, J.I.**, "Factors Affecting Skim Milk Progesterone Assay Results", *American Journal Of Veterinary Research* July 1992. V. 53 (7)
- 50. Pennington, J.A., Spahr, S.L., Lodge, J.R.**, "Influences on progesterone concentration in bovine milk", *Journal of Dairy Science*, Volume 64, Issue 2, February 1981, Pages 259-266.
- 51. Samsonova, J. V., Safronova, V.A., Osipov, A.P.**, "Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk", *Talanta* 132 (2015) 685–689.
- 52. Delahaut, Ph., Beckers, J.F., Ectors, F.**, "Effet de l'azide de sodium sur la dégradation de la progesterone dans les échantillons de sang total chez les bovins", *Ann.Méd.Vét.*, 123 (1979) 567-572.
- 53. Pulido, A., Zarco, L., Galina, C. S., Murcia, C., Flores, G., Posadas, E.**, "Progesterone metabolism during storage of blood samples From gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation", *Theriogenology*, MAY 1991 VOL. 35 NO. 5, pp: 965-975
- 54. Inns, J.H, Cecchini, G., Mattoni, M.**, "The effect of anticoagulant, storage time and temperature, and sodium azide on blood progesterone concentrations", *Int Livestock Center Africa (ILCA) Bull* 1989; 33: 9–13.
- 55. Tahir, M.Z., Thoumire, S., Raffaelli, M., Grimard, B., Reynaud, K. et Chastant-Maillard, S.**, "Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch", *Domestic Animal Endocrinology* 45 (2013) 141–144.

- 56. Christensen, A.C.M., Haresign, W., Khalid, M.,** «Progesterone exposure of seasonally anoestrous ewes alters the expression of angiogenic growth factors in preovulatory follicles», *Theriogenology* 81 (2014) 358–367
- 57. DeNicolo, G., Morris, S. T., Kenyon, P. R., Kemp, P. D, Morel, P.C.H.,** "Ewe reproduction and lambing performance in a five period mating system", *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 2008, Vol 51: 397-407
- 58. Yu, S.J. et Li, F.D.,** "Profiles of plasma progesterone before and at the onset of puberty in yak heifers", *Animal Reproduction Science* 65 (2001) 67–73
- 59. Cooke, R.F. et Arthington, J.D.,** "Plasma progesterone concentrations as puberty criteria for Brahman-crossbred heifers", *Livestock Science* 123 (2009) 101–105
- 60. Moran, C., Quirke, J.F. Roche, J.F.,** "Puberty in Heifers: a Review", *Animal Reproduction Science*, 18 (1989) 167-182 167
- 61. Cutullic E., Delaby L., Gallard Y., Disenhaus C.,** "Intérêt du dosage de la progestérone dans le lait lors des premiers contrôles laitiers pour prédire la cyclicité des vaches laitières après vêlage", *Renc. Rech. Ruminants*, 19 (2012) 341-344.
- 62. Kornmatitsuk, S., Kornmatitsuk, B., Chantaraprateep, P., Larsson, B.,** "Characteristics of oestrous cycles in Holstein cross-bred dairy heifers: An evidence of delayed post-ovulatory progesterone rise", *Trop Anim Health Prod* (2009) 41:337–344, DOI 10.1007/s11250-008-9194-6
- 63. Point, F.,** "Contribution a l'étude de la détection des chaleurs par vidéosurveillance chez la vache Laitière. Comparaison avec les profils de Progestérone", Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, université CLAUDE - BERNARD - LYON I, (Médecine et Pharmacie) octobre 2007.
- 64. Nagy, P., Huszenicza, Gy., Reiczigel, J., Juhasz, J., Kulcsar, M., Abavary, K., Guillaume, D.,** "Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares", *Theriogenology* 61 (2004) 203–214.
- 65. Delwiche, M., Tang, X., BonDurant, R., Munro, C.,** "Estrus detection with a progesterone biosensor", Vol. 44(6): 2003–2008,(2001), *American Society of Agricultural Engineers* ISSN 0001–2351.

- 66. Matiko, M.K., Kanuya, N.L., Waldmann, A., Ropstad, E., Reksen, O.,** "Environmental constraints on post-partum ovarian activity in Tanzanian Zebu cows", *Theriogenology* 69 (2008) 896–904
- 67. De Rensis, F., Lopez-Gatius, F., Capelli, T., Molina, E., Techakumphu, M., Scaramuzzi, R.J.,** "Effect of season on luteal activity during the post-partum period of dairy cows in temperate areas", *Animal* (2008), 2:4, 554-559.
- 68. Ledoux, D., Touze, J.L., Laigre, P., Grimard, B.,** "Anomalies de reprise de cyclicité post partum chez la vache laitière Prim'Holstein : facteurs de risque et relation avec les structures ovariennes vues par échographie", *Renc. Rech. Ruminants*, 2007, 14
- 69. Mann, G.E., Keatinge, R., Hunter, M., Hedley, B.A., Lamming, G.E.,** "The use of milk progesterone to monitor reproductive function in beef suckler cows", *Animal Reproduction Science* 88 (2005) 169–177
- 70. Shrestha, H.K., Nakao, T., Higakib, T., Suzukib, T., Akitac, M.,** "Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows", *Theriogenology* 61 (2004) 637–649
- 71. Kerbrat, S. et Disenhaus, C.,** "Profils d'activité lutéale et performances de reproduction du vêlage à la première insémination", *Renc.Rech.Ruminants*, 2000, 7, 227-230.
- 72. Butterfield, W.A. and Lishman, A.W.,** "Progesterone profiles of postpartum dairy cows as an aid to diagnosis and treatment of reproductive disorders", *A.Afr.J.Anim.Sci.*1990, 20(4) 155-160
- 73. Szelényi, Z., Répási, A., De Sousa, N.M., Beckers, J.F. et Szenci, O.,** "Accuracy of diagnosing double corpora lutea and twin pregnancy by measuring serum progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 in the first trimester of gestation in dairy cows", *Article in press Theriogenology* xxx (2015) 1–6.
- 74. Breukelman, S.P., Perényi, Z., Taverne, M.A.M., Jonker, H., Van Der Weijden, G.C., Vos, P.L.A.M., de Ruigh, L., Dieleman, S.J., Beckers, J.F. et Szenci, O.,** "Characterisation of pregnancy losses after embryo transfer by measuring plasma progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 concentrations", *The Veterinary Journal* 194 (2012) 71–76.
- 75. Gorzecka, J., Codrea, M.C., Friggens, N.C., Callesen, H.,** "Progesterone profiles around the time of insemination do not show clear differences between of pregnant and not pregnant dairy cows", *Animal Reproduction Science* 123 (2011) 14-22.

- 76. Reksen, O., Gröhn, Y.T., Havrevoll, Ø., Bolstad, T., Waldmann, A., Ropstad, E.,** "Relationships among milk progesterone, concentrate allocation, energy balance, milk yield and conception rate in Norwegian cattle", *Animal Reproduction Science* 73 (2002) 169–184
- 77. Abeygunawardena, H., Alexander, P.A.B.D., Abeygunawardena, I.S. et Perera, B.M.A.O.,** "Use of milk progesterone RIA to determine factors affecting the success rate of artificial insemination services in cattle in mid-country smallholder farms in Sri Lanka", *Tropical Agricultural Research and Extension* 3 (1): 2000,75-81.
- 78. Regal, P., Cepeda, A., Fente, C.,** "Development of an LC-MS/MS method to quantify sex hormones in bovine milk and influence of pregnancy in their levels", *Food Additives and Contaminants*, Vol. 29, No. 5, May 2012, 770–779
- 79. Otava, G., Cernescu, H., Mircu, C., Igna, V.,** "Pregnancy diagnosis in cow using progesterone measurements", *Lucrări Stiințifice Medicină Veterinară. XL Timisoara* (2007) 95-98
- 80. McNeill, R.E., Diskin, M.G., Sreenan, J.M., Morris, D.G.,** "Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows", *Theriogenology*, Volume 65, Issue 7, 15 (April 2006) 1435-1441
- 81. Stronge, A.J.H., Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Mee, J.F., Kenny, D.A. et Morris, D.G.,** "Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows", *Theriogenology*, Volume 64, Issue 5, 15 September 2005, Pages 1212-1224
- 82. Alam, M.G.S., Ghosh, A.,** "plasma and milk progesterone concentrations and early pregnancy in zebu cows", *A.J.A.S.*, vol.7, N°1 (1994) 131-136.
- 83. Eissa, H.M., Nachreiner, R.F., Refsal, K.R.,** "Skim milk progesterone in pregnant cows from Insemination throughout lactation", *Veterinary Research Communications*, 18 (1994) 149-154.
- 84. Rajamahendran, R., Burton, B., Shelford, J.,** "A field study on the usefulness of milk progesterone determination to confirm estrus and pregnancy of dairy cows in the Fraser Valley area of British Columbia", *Can Vet J* Volume 34, June 1993.
- 85. Kay, G.W., van Zyl, J.P., Naude, R.T.,** "Milk progesterone concentrations: an accurate early pregnancy diagnostic aid in dairy cattle", *A.Afr.J.Anim.Sci.*1985, 15 151-154.

- 86. Bisinotto, R.S., Pansani, M.B., Castro, L.O., Narciso, C.D., Sinedino, L.D.P., Martinez, N., Carneiro, P.E., Thatcher, W.W. et Santos, J.E.P.,** "Effect of progesterone supplementation on fertility responses of lactating dairy cows with corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol", *Theriogenology* 83 (2015) 257–265
- 87. Reyes, J.M., Murcia, C., Zarco, L., Alvarez, L.,** "Progesterone concentrations in milk of CIDR-treated goats", Short communication, *Small Ruminant Research* 106 (2012) 178–180
- 88. Chenault, J.R., Hornish, R.E., Anderson, Y.C., Krabill, L.F., Boucher, J.F., Prough, M.J.,** "Concentrations of Progesterone in milk of Cows Administered an Intravaginal Progesterone Insert", *Journal of Dairy Science*, Volume 86, Issue 6, June 2003, Pages 2050-2060
- 89. Zarkawi, M.,** "Oestrous synchronisation and twinning rate of Syrian Awassi ewes treated with progestagen and PMSG during the breeding season", *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 2001, Vol. 44: 159-163, 0028-8233/01/4402&3-0159 7.00/0 © the Royal Society of New Zealand 2001, 159
- 90. Boland, M.P., Foulkes, J.A., Macdonnell, H.F. et Sauer, M.J.,** "Plasma progesterone concentrations in Superovulated heifers determined by Enzymeimmunoassay and Radioimmunoassay", *Br. vet. J.* (1985). 141, 409-415
- 91. Shrestha, H.K., Nakao, T., Higaki, T., Suzuki, T., Akita, M.,** "Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows." *Theriogenology* 61 (2004) 637–649
- 92. Krone, N., Hughes, B.A., Lavery, G.G., Stewart, P.M., Arlt, W., Shackleton, C.H.L.,** "Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a preeminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) ", Published as: *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 August; 121(3-5): 496–504
- 93. Siekmann, L.,** "Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: A definitive method in clinical chemistry", *J Steroid Biochem* 11, (1979) 117–123
- 94. Larsen, A.E.,** "Gas chromatographic analysis of estrogen and progesterone metabolites in human pregnancy urine", *Am J Med Technol.* 1971 Jul; 37(7):279-91.

- 95. Purdy, R.H., Durocher, C.K., Moore, P.H. Jr., Rao, P.N.,** "Analysis of metabolites of progesterone in bovine liver, kidney, kidney fat, and milk by high performance liquid chromatography", *J Steroid Biochem.* 1980 Nov; 13 (11):1307-1315.
- 96. Sinreih, M., Zukunft, S., Sosič, I., Cesar, J., Gobec, S., Adamski, J. et Rižner, T.L.,** "Combined Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Progesterone Metabolites", John Matthew Koomen, Academic Editor, Published online 2015 Feb 13. doi: 10.1371.
- 97. Tripp, K.M., Dubois, M., Delahaut, P. et Verstegen, J.P.,** "Detection and identification of plasma progesterone metabolites in the female Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) using GC/MS/MS", *Theriogenology* 72 (2009) 365–371
- 98. Geertruida, A., Trumpie, P., Amerongen, A.V., Korf, J., Van Berkel, W.J.H.,** "Review: Perspectives for on-site monitoring of progesterone", *Trends in Biotechnology* Vol.27 No.11 (2009) 652-660.
- 99. Miles, L.E. and Hales, C.N.,** "Labelled antibodies and immunological assay systems." *Nature.* 1968 Jul 13; 219(5150):186-9.
- 100. Köhler, G., Milstein, C.,** "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975." *J Immunol.* 2005 Mar 1; 174(5):2453-5.
- 101. Isobe, N., Nakao.T., Yamashiro, H., Shimada.M.,** "Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle", *Anim Reprod Sci* 87(2005), 1–10.
- 102. Colazo, M.G., Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Small, J.A.,** "Comparison of 2 enzyme immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk", *Can J Vet Res* 72, (2008) 32–36.
- 103. Parini, C., Bacigalupo, M.A., Colombi, S., Ferrara, L., Franceschetti, F. and Saita, R.,** "Two new fluorescent derivatives of progesterone to use in Fluoroimmunoassay", *Steroids*, Volume 46, Numbers 4, 5, October, November 1985, 903-913.
- 104. Oku, Y., Osawa, T., Hirata, T.I., Kon, N., Akasaka, S., Senosy, W.S., Takahashi, T., Izaike, Y.,** "Validation of a direct time-resolved fluoroimmunoassay for progesterone in milk from dairy and beef cows." *The Veterinary Journal* 190 (2011) 244–248

- 105. Lee, H., Park, C.J., Lee, G.,** "Measurement of progesterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with the commercial chemiluminescence immunoassay", *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 1713-1719.
- 106. Benoist, J.F., Biou, D., et Chevenne, D.,** "Chapitre 2 : Dosage des marqueurs biologiques par immunoanalyse. In *Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives*", 2^{ème} édition revue et augmentée par Jean-Louis Beaudoux et Geneviève Durand. Ed : lavoisier (2011) 9-38. ISBN : 2257204727.
- 107. Bador, R., Barbier, Y., Bornet, H., Charrie, A., Charriere, G., Cohen, R., Dechaud, H., Grillet, S., Hartmann, D., Krebs, B., Lasne, Y., Latapie, M.J. et Ville, G.,** "Les immunodosages: de la théorie à la pratique", LYON, 1992.
- 108. Yalow, R. et Berson, S.,** "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man", (1960) 1157-1175
- 109. Benlot, C. et Blanchouin, N.,** "Methodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules" *Biologie et Multimédia*, Université Pierre et Marie Curie UFR des Sciences de la vie, 2007.
- 110. Bourrel, F. et Courrière, P.,** "Radioanalyse - Définitions et techniques", *Techniques de l'ingénieur. L'expertise technique et scientifique de référence* (2003), p3360
- 111. Eisenhut, M., Mier, W.,** "Radioiodination Chemistry and Radioiodinated" Compounds Attila Ve'rtés and al (eds.), *Handbook of Nuclear Chemistry*, DOI 10.1007/978-1-4419-0720-2_44, # Springer Science+Business Media B.V. 2011
- 112. Bailey, G.S.,** "The Chloramine T Method for Radiolabeling Protein." In *The Protein Protocols Handbook*, Editors: John M. Walker, ISBN: **978-0-89603-940-7 (Print) 978-1-59259-169-5 (Online)**, Humana Press (2002) pp 963-965
- 113. Conlon, J.M.,** "Preparation of ¹²⁵I-Labeled Peptides and Proteins with High Specific Activity Using IODO-GEN." In: Walker J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, (2009) pp 1735-1742
- 114. Ville, G. et Hartmann, D.,** "Chapitre 6 : Immunodosages avec marqueurs radioactifs. Les immunodosages de la théorie à la pratique", Ed ACOMEN, 1989, 249p, ISBN : 2-907794-00-0.

- 115. Andres, R.Y.**, "Iodinated tracers for radioimmunoassay: Preparation and purification", (IAEA-SM-259/102, in Radioimmunoassay and related procedures in medicine 1982, proceedings of a symposium Vienna 21-25 June (1982) 133-146
- 116. Patel, AC., Matthewson, S.R.**, "Radiolabeling of peptides and proteins." In: Walker JM, Raphley R, editors. *Molecular Biometrics Handbook*. Second ed. Totowa NJ: Humana Press Inc; 1998. pp. 401–5.
- 117. Hunter, W.M., Greenwood, F.C.**, "Preparation of iodine-131-labelled human growth hormone of high specific activity", *Nature (London)* **194** (1962) 495
- 118. Bolton, A.E.**, "Radioimmunoassay. In *Immunoassays for the 80s*", Vollet A, Bartlett A, Bidwell D (ed), (1981), 69-83.
- 119. Law, B.**, "Radiolabelling procedures for radioimmunoassay", In *Immunoassay. A Practical Guide*, chapitre 5, Ed Taylor & Francis e-Library UK, 5, (2005), 64-99
- 120. Mitra. A.**, "Nouveaux radiotraceurs peptidiques pour l'imagerie nucléaire Radiomarquage, évaluations physico-chimiques et Pharmacologiques", Thèse de Université Joseph Fourier – Grenoble I (U.F.R de Médecine) (2008) 238p.
- 121. Corrie, J.E.T.; Hunter, W.M.; Macpherson, J.S.**"A Strategy for Radioimmunoassay of Plasma Progesterone with Use of Homologous-Site ¹²⁵I-Labeled Radioligand." *Clin. Chem.* 1981, 27(4), 594–599.
- 122. Karir, T.; Nagvekar, U.H.; Samuel, G.; Sivaprasad, N.; Chaudhuri, P.; Samad, A.**," Studies on the Influence of the Structural Modifications in the Tracer on the Immunoassay of Progesterone." *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2006, 267(2), 321–325
- 123. Karir, T., Pal, N., Sivaprasad, N.**,"Radioimmunoassay kit Formulation and its Validation for Serum Progesterone using Radiotracer Purified by Gel Filtration." *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2003, 256(1), 127–131.
- 124. Kothari, K.; Lal, R.; Pillai, M.R.A.**, "Development of Direct Radioimmunoassay for Serum." Progesterone." *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1995, 196(2), 331–338.
- 125. Toth, G.**, " A general approach to the chromatographic behaviour of ¹²⁵I-labelled iodothyronines and tyrosine methyl ester derivatives of steroids." *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1988, 121(1), 17–27.

- 126. Tolmachev, V., Orlova, A., Lundqvist, H.,** "Optimization of iodination of [125 I]-N-succinimidyl-para-iodobenzoate using Chloramine-T for labeling of proteins." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 246, No. 1 (2000) 207–213
- 127. Kothari, K.; Pillai, M.R.A.** "Preparation and Characterization of 125 I Labeled Progesterone Derivatives for the Development of a Radioimmunoassay for Progesterone" *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1994, 177, 261–269.
- 128. Grace, S.; Venkatesh, M.; Balakrishnan, S.A.; Sarma, H.D.,** "Preparation of 125 I Labeled Testosterone Derivatives for Use in Radioimmunoassay." *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1997, 223(1–2), (1997) 83–87.
- 129. Allen, R.M., Redshaw, M.R.,** "The use of homologous and heterologous 125 I radioligands in the radioimmunoassay of progesterone" *Steroids* 31, 467, 1978.
- 130. Wagener, J.M., Perera, O., Khadra, M.,** "Production of 125 I-Progesterone Tracer" *Medimond-Monduzzi Editore International Proceedings Divisions*, 25 Apr 2005, J Alanis and JM Navarrete.
- 131. Tantchou, J.K., Slaunwhite, Jr.W.R.,** "The Synthesis of 125 I-2-Iodohistamine for Radioimmunoassay." *Prep. Biochem. Biotech.* 1979, 9(4), 379–390.
- 132. Ekins, R.P.,** "The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique", *Clin. Chim. Acta* 5; (1960) 452–459.
- 133. Catt, K.J., Tregear, G.W., Burger, H. G.,** "Radioimmunoassay of polypeptide hormones in antibody-coated tubes", (IAEA-SM- 124/62), *Proceedings Of The Symposium On In Vitro Procedures With Radioisotopes In Clinical Medicine And Research*, Organized By The International Atomic Energy Agency In Co-Operation With The World Health Organization, And Held In Vienna, 8- 12 September 1969. *In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine AIEA Vienne* 1970
- 134. Mériadec, B., Jolu, J.P., Henry, R.,** "A New and Universal Free/Bound Separation Technique for the CENTRIA Automated Radioimmunoassay System", *CLIN. CHEM.* 25/9, 1596-1599 (1979)
- 135. Cornale, P., Bonazzi, M., Multinu, C., Romelil, P., Vancherl, L., Pennisi, F.,** "Column Affinity Chromatography for Bound/Free Separation in Ligand Assays. I. Radioimmunoassay of Choriomammotropin (Human Placental Lactogen)", *Clin. Chem.* 27/6, 896-900 (1981)

- 136. Steimer, Th., Theintz, G.E., Sizonenko, P.C. et Herrmann, W.L.,** "Hydrophobic Interaction Chromatography (Hic) For The Separation Of Protein-Bound And Free Steroids", Application To Binding Protein And Receptor Assays. *J. Steroid Biochem.* Vol. 23, No. 6A, pp. 955-965, 1985
- 137. Barbier, Y.,** "chapitre 4 : Principes généraux des immunodosages. Les immunodosages de la théorie à la pratique", Ed ACOMEN, 1989, 249p, ISBN : 2-907794-00-0.
- 138. Causse, J.E., Ricordel, I., Bacheller, M.N., Kaddouche, F., Nom, B., Well, R., Descomps, B., Yver, J.P.,** "Radioimmunological Determination of Total Thyroxin by Antibodies Immobilized on Polystyrene Tubes Coated with Styrene-Maleic Anhydride Copolymers", *Clin. Chem.* 36/3, 525-528 (1990)
- 139. Porstmann, T. and Kiessig, S.T.,** "Enzyme immunoassay techniques", An overview. *Journal of Immunological Methods*, 150 (1992) 5—21
- 140. Jyotsna, N., Singh, Y., Chouthkanthiwar, V., Paradkar, S., Sivaprasad, N.,** "Development Of Simple Immunoradiometric Assays Using Avidin Coupled To Polystyrene Beads As A Common Solid Phase", International symposium of modern trends in radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy, IAEA, Portugal, 1998, pp:351-358.
- 141. Hales, C.N. et Randle, P.J.,** "Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate", *Biochem.J.*, 88 (1963) 137-146.
- 142. Kumar.V.,** "Radioimmunoassay" Distance Assisted Training Programme for Nuclear Medecine Technologists, Units 14a, AIEA, Ed H.E.Patterson et B.F.Hutton, (2009) 35p
- 143. Bulter, J.E.,** "Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays", *METHODS* 22, (2000) 4–23
- 144. Nisnevitch, M. et Firer, M.A.,** "Review, The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment", *J. Biochem. Biophys. Methods* 49(2001).467–480
- 145. Rao, S.V., Anderson, K.W. et Bachas, L.G.,** "Fundamental Review: Oriented Immobilization of Proteins", *Mikrochim. Acta* 128, 127-143 (1998)
- 146. Packard Instrument Company. (PIC),** "Solid-phase RIA in microplates", TopCountTopics, (1996), PAN0088 11/96 USA, 5p

- 147. Butler, J.E., Ni, L., Nessler, R., Joshi, K.S., Suter, M., Rosenberg, B., Chang, j., Brown, W.R., Cantarero, L.A.,** "The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene", *Journal of Immunological Methods*, 150 (1992) 77-90
- 148. Schiettecatte, J., Anchaert, E., Smitz, J.,** "Interferences in Immunoassays", Chapitre 3 in *Advances in Immunoassay Technology*, Ed Dr Norman H.L. Chiu (2012), ISBN 978-953-51-0440-7.
- 149. Franek, M.,** "Structural aspects of steroid_antibody specificity" Review, *J. steroid.Biochem.* vol.28, No.1, (1987) 95-108
- 150. Sapin, R.,** "Mise au point, Interférences dans les immunodosages: mécanismes et conséquences en endocrinologie", *Annales d'Endocrinologie* 69 (2008) 415-425.
- 151. Piketty, M.L., Lebtahi, R., Dumont, A., Chevenne, D., Dilouya, A.,** " La réaction croisée en immuno-analyse" *Revue générale et analyses prospectives, Immunoanal Biol Spéc* (1994) 9, pp 285-292.
- 152. Bowen, R.A., Vu C., Remaley A.T., Hortin G.L., Csako G.,** "Differential effect of blood collection tubes on total free fatty acids (FFA) and total triiodothyronine (TT3) concentration: a model for studying interference from tube constituents", *Clin Chim Acta* 378 (2007) 181-193
- 153. Ezan, E., Mamas, S., Rougeot, C., Dray, F.,** " Immuno-analyse des haptènes : optimisation des performances." *Trait - d'Union*, Volume 3, Issue 1, March 1988, Pages 14-20
- 154. Lupi-Chen, N., Hoang, B.M., Caila, H.,**"Immunodosage des stéroïdes : testostérone, progestérone et cortisol chez les animaux", *Immunoanal Biol Spéc* 1999, 269-275.
- 155. Guéris, J., et Ferrière, C.,** "A propos des molécules utilisées pour la confection des courbes d'étalonnage. *Immunoanal Biol Spéc.* (1989) 15, 19-22.
- 156. Feinberg, M.,** "Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude." *Techniques de l'Ingénieur* (2012), p224
- 157. Ducauze, C., Baillet-Guffroy, A., Bui, T. X.,** "Choix et validation d'une méthode d'analyse" *agroparistech*

- 158. Blanchin, M.D.,** " Validation des méthodes d'analyse " Journées Qualité et Chimie 2010 Une démarche qualité au service de la chimie Autans - 14 octobre 2010, Laboratoire de Chimie Analytique 40 Diapos.
- 159. Dingeon,B., Dreyfuss, M. F., Gaillard, Y., Le Bouil,A., Lhermitte,M., Mazzega, S., Moulsm,a,M., Pépin,G., Perrin,M., Plesse,J., Roussel,O., Thevenot,M.T., Vinner,E., Deveaux,M.,** " Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique" Annales de Toxicologie Analytique, vol. XVII, n° 3, supplément 1, 2005, 20p
- 160. FAO/AIEA** joint programme Animal production and health "Self coating milk progesterone RIA Kit" Bench protocol January 1997
- 161. Thorell, J., Larson, S.M.,** "Radioimmunoassay and related techniques" C V Mosby, St. Louis, Mo. (1978), p 275
- 162. Garaud. J.C et Roussel.G.,** "Immunohistochimie en microscopie photonique et electronique : théorie et pratique" Ed:IHC, version 2007.1, 295p
- 163. Robles, A. M., Balter, H.S., Oliver,P., Welling, M.M., Pauwels, E.K.J.,** "Improved radioiodination of biomolecules using exhaustive Chloramine-T oxidation" Nuclear Medicine and Biology 28 (2001) 999 –1008
- 164. Peake, G.T.,** in Methods of hormones radioimmunoassay. Academic Press, New York (1974) p.103
- 165. Ekins R.P., Newman G.G.B., O’riordan J.L.H.** (1967) Theoretical aspects of « saturation » and radioimmunoassay radioisotops in medecine. In: in vitro studies, Proceedings Symposuim,.Oak Ridge US Atomic Energy Commission .59-100.
- 166. Edward, D.P.,** 'Immunoassay, an introduction". First edition. William Heinmann medical book. 1985
- 167. Law, B., Biddlecombe, R.A.,** "Radioimmunoassay development and optimization", In Immunoassay. A Practical Guide, chapitre 6, Ed Taylor & Francis e-Library UK, 5, (2005), 100-132
- 168. Hegen, J.,Tu J.U., Purty, D.R.K ., Micholoff, B. L.,** "Human thyrotropin radiolabeled ; specific activity ,zero binding and stability." Clin.Chem. (1980) 29:1870.
- 169. Westphal, U.,** "Steroid Protein Interactions II" volume 27, de Monographs on Endocrinology, Éditeur Springer Berlin Heidelberg, ISBN 3540153217, 9783540153214, 603 pages

- 170. Bochskanl, R., Thie, M., Kirchner, C.,** " Active immunization of rabbits against progesterone: increase in hormone levels, and changes in metabolic clearance rates and in genital tract tissues." *Journal of steroid biochemistry*, Vol : 33, ISSN : 0022-4731, 1989 Sep, pp 349-55
- 171. Fiet J, Galons H, Villette JM, Boudou P, Guechot J, Gueux B,et al.,** " Problèmes particuliers posés par l'immunodosage des stéroïdes." *Immuno Anal Biol Spec* 1990; 5:41- 52.
- 172. Miyauchu, F.,** " A specific 125I radioimmunoassay methods for progesterone." *Bull Yamaguchi Med Sch*, volume 25, Nos 3-4 (1978) 161-169
- 173. Scarisbrick, J.J., Cameron, E.H.D.,**"Radioimmunoassay of Progesterone: Comparison of [1, 2, 6, 7-3H4]-Progesterone and Progesterone-[125I]-Iodohistamine Radioligands." *J. Steroid Bioch.* 1975, 6, 51–56.
- 174. Dighe, K.K. and Hunter, W.M.,** "A solid phase Radioimmunoassay for plasma progesterone" *Biochem.J* (1974) 143, 219-231
- 175. Espinosa, J., Botana, L.M., Puentes, E., Regueiro, B.J.,** " Milk progesterone radioimmunoassay using radioiodinated tracers: a rapid and reliable assay system." *Steroids*. 1984 Sep; 44(3):217-28.
- 176. Brochu, M., Veilleux, R., Lorrain, A., Belanger, A.,** " Monoclonal Antibodies for Use with 125iodine Labeled Radioligands. In Progesterone Radioimmunoassay." *J.Steroid Biochem.* 1984 Oct 21(4):405-11.
- 177. Karir, T., Nagvekar, U. H., Samuel, G., Sivaprasad, N., Chaudhuri, P., Samad, A.,** " Estimation of progesterone in buffalo milk by radioimmunoassay" *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 267, No.2 (2006) 321–325
- 178. Barnard, G., De Boever, J., Kohen, F.,** " Alternatives to Radioimmunoassay." Kamely D. and al (eds), *Biotechnology: Brindging Research and Applications*, 1991, 63-78
- 179. Chard T., Van Vunakis H., Laungone J.,** in " *Methods in Enzymology* " Ed. Academic press .vol .70, part A. (1980) pp 280-298.
- 180. Zhao, L., Lin, J-M., Li, Z.,** "Comparison and development of two different solid phase chemiluminescence ELISA for the determination of albumin in urine." *Analytica Chimica Acta* 541(1-2) June 2005:197-205 · DOI: 10.1016/j.aca.2005.03.027

- 181. Copley, C.G., Law, B., Jenner, W.N.**, "Immunology and the production of reagent antibodies", In Immunoassay. A Practical Guide, chapitre 4, Ed Taylor & Francis e-Library UK, 5, (2005), 32-63.
- 182. Catt, K.J., Niall, H.D., Tregear, G.W.**, "Solid-phase radioimmunoassay of human growth hormone", *Biochem.J.* 100, (1966) 31p
- 183. Rej, R. and Drake, P.**, "The Nature of Calibrators in Immunoassays: Are They Commutable With Test Samples? Must They Be?" *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum.* February 1991 DOI: 10.3109/0036551910910460147-54
- 184. Wood, W.G.**, "Matrix Effects" In Immunoassays" *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1991; 205:105-12.
- 185. Ezan, E., Tiberghien, C., Dray, F.**, "Practical method for optimizing radioimmunoassay detection and precision limits." *Clin Chem.* 1991 Feb; 37 (2):226-30.
- 186. Byszewska-Szpocin'ska, E.; Markiewicz, A.**"New RIA Kit for the Determination of Progesterone in Cow's Milk." *J. Immunoass. Immunoch.* 2006, 27, 279–288.
- 187. Chrière, G., Cohen, R., Grillet, S., Krebs, B.**, " Contrôle de qualité" Chapitre9 in : *Les immunodosages de la théorie à la pratique.* Ed: A.Comon, 1989, 171-208
- 188. He, J.**, "Immunoassay development " Chapitre 5 in: *The Immunoassay Handbook: theory and application of ligand binding ELISA and related techniques.* Ed:D.Wild, Elsevier Science 2013, 1036p.
- 189. Canépa, S., Lainé, A.L., Bluteau, A., Fagu, C., Flon, C., et Monniaux, D.**, " Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins" *Cah. Techn. Inra*, 2008, 64, 19-30.

Publication
