

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de

Master

Option : Biologie et Physiologie de la Reproduction

Thème

*Etude rétrospective sur le Radioimmunos dosage de
la progestérone chez le bovin, un outil de diagnostic.*

Soutenu le 28 /09 /2020

Présenté par : M^{lle} BENMANSOUR Hiba

Devant le Jury :

Mr. BESSAAD M. A.	MCA	U. Blida 1	Président
Mme MAKHLOUF C.	MAA	U. Blida 1	Examinatrice
Mme BENABDELAZIZ A.	Chercheur Principal	(CRND)	Promotrice
Mr. LARBI DOUKARA K.	MC B	U. Blida 1	Co-promoteur

2019/2020

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique

I. Caractéristiques générales du cycle œstral de la vache..... 4

I.1.Définition 4

I.2.Les étapes du cycle 4

I.2.1.La phase folliculaire 4

I.2.2_La phase lutéale 4

I.3.les changements hormonaux au cours du cycle sexuel..... 5

I.4.Mécanismes hormonaux de régulation du cycle 6

I.5.La gestation 9

I.6.L'activité ovarienne post-partum 9

II. Gestion de la fonction de reproduction..... 10

III. Détermination de l'état physiologique de la vache par le dosage de la Progestérone..... 11

III.1.Structure de la progestérone 11

- Propriété biologique et physique 11

- Biosynthèse 12

- Transport 12

- Catabolisme et Elimination..... 12

III.2.Evolution de la progestérone au cours d'un cycle sexuel de la vache 12

III.3.Intérêt du dosage de la progestérone chez les femelles d'élevage 13

IV. Les techniques de dosage de la progestérone 15

IV.1.Les dosages immunologiques 15

IV.2.Bases physico-chimiques du système antigène-anticorps 15

IV.3.Le Radioimmunos dosage (RIA) « Radio ImmunoAssay » 17

IV.3.1 Principe des techniques 17

IV.3.2 Composition d'une trousse de radioimmunos dosage 20

IV.3.3 Validation d'une trousse radioimmunologique 21

IV.3.3.1 Evaluation analytique de la trousse 21

a) La limite de détection	21
b) Le test de précision	22
c) Le test d'exactitude	22
- <i>Test de dilution.</i>	22
- <i>Test de surcharge</i>	22
IV.3.3.2 Evaluation clinique de la trousse	23
IV.4.Les interférences en immunodosages	23

CHAPIRE 2 : Matériel et méthodes

1. Réactifs et Matériels :	27
2. Le tampon phosphate (TP)	28
3. Protocole de dosage RIA de la progestérone	28
4. Evaluation analytique de la trousse commerciale 'Immunotech' pour le dosage de la progestérone dans des échantillons sériques bovins	28
a <i>_Le test de précision</i>	29
b <i>_Le test d'exactitude</i>	29
- Test de dilution	29
- Test de surcharge	29
5. Préparation du sérum bovin déplété (SBD)	29
6. Préparation des étalons de progestérone	30
6.1. Préparation et calibration de la solution mère de progestérone	30
6.2. Préparation des étalons de progestérone dans un tampon phosphate	30
7. Calibration des étalons par une trousse RIA progestérone commerciale	31
8. Evaluation clinique de la trousse commerciale 'Immunotech' pour le dosage de la progestérone d'échantillons de sérums de vaches	31
• Cas des standards reconstitués dans un tampon phosphate (TP)	31
• Cas des standards reconstitués dans le sérum bovin déplété (SBD)	32
9. Analyses statistiques des données expérimentales	32

CHAPITRE 3 : Résultats et Discussion

1. Evaluation analytique de la trousse commerciale 'Immunotech' pour le dosage de la Progestérone dans des échantillons sériques bovins	34
1.1 Le test de précision	34
1.2 Le test d'exactitude	35
➤ Tests de dilution	35
➤ Tests de surcharge	38

2. Calibration des étalons de progestérone préparés dans différentes matrices	40
3. Evaluation clinique de la trousse commerciale ‘Immunotech ‘pour le dosage de la progestérone d’échantillons sériques bovins et comparaison aux résultats des gammes étalons sérum bovin préparées.....	43
• Evaluation des courbes d’étalonnage progestérone des différentes matrices	43
• Evaluation des résultats de concentrations de progestérone des sérums bovin.....	45
Conclusion.....	49
Références Bibliographiques.....	53
Annexes.	

Remerciement

La première personne que je tiens à remercier ma promotrice, Madame Benabdelaziz Aldjia (khelili), pour la confiance qu'elle m'a accordé pour l'élaboration de ce travail, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils judicieux, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Chaleureux remerciements.

Mes remerciements s'adressent aussi à monsieur Larbi Doukara Kamel pour avoir codiriger ce travail pour son soutien, pour ses précieux conseils méthodologiques.

Toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à monsieur BESSAAD M. A. qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury du mémoire.

Hommage respectueux, à Madame MAKHLOUF C. pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail. Et de l'enrichir par ses propositions

Je tiens à remercier spécialement Mrs khelili Rachid et Mr Abdelli Amine ; chercheurs au centre de recherche nucléaire pour leurs disponibilités ; leurs conseils ; leurs orientations ; pour leurs aide précieuse a la réalisation de ce travail.

Je remercie particulièrement Dr Mimoune Nora ; Maitre de conférences à l'ENSV. pour ses conseils et ces encouragements.

Je désire aussi remercier Monsieur le Directeur Général du Centre de Recherche Nucléaire de Draria, pour m'avoir autorisé à réaliser ce mémoire au sein de son établissement. Et pour son accueil.

Enfin, Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail pour mes chers parents, et Je tiens à les remercier pour leur soutien permanent, constant ; avec la patience et la confiance que vous avez toujours placée en moi, vous m'avez permis d'avancer en toute quiétude. J'espère qu'ils trouveront en ce modeste travail une récompense de ce qu'ils ont fait pour moi.

A ma sœur Lina et mes frères Abderrahmane et Yacine et Adem.

A toute ma famille et sur tout ma grande mère et a tous mes amies.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Résumé

La technique de radioimmunos dosage RIA de compétition est une méthode immunologique, préconisée pour le dosage direct de la progestérone. Du fait de sa haute sensibilité, spécificité, reproductibilité et facilité d'utilisation, les trousse commerciale radioimmunologiques se sont accréditées dans le monde de l'endocrinologie.

Cependant, ces analyses sont souvent astreintes à de nombreuses interférences susceptibles d'affecter la performance du dosage et engendrer des résultats erronés. Dans cette étude nous avons traité de l'impact généré sur les performances analytiques et cliniques de la trousse RIA commerciale, validée pour les tests sériques de progestérone humaine, suite à son utilisation pour un dosage direct de la progestérone dans des échantillons de sérum de vaches.

Nous avons aussi comparé les résultats du test clinique obtenus, à ceux après remplacement de la gamme d'étalons fournie dans la trousse, par d'autres gammes d'étalons préparées dans une matrice sérum bovin.

Les résultats obtenus montrent que l'usage intégral de la trousse commerciale dans le dosage de sérums de vaches a affecté sensiblement les performances analytiques (sensibilité, précision et exactitude) et cliniques (concentrations en progestérone à différents stades physiologiques) de la trousse commerciale, particulièrement pour la zone des faibles concentrations.

De plus, la substitution de la gamme d'étalons de la trousse par une gamme d'étalons préparée dans un tampon, calibrée et reconstituée dans un sérum bovin déplété, constitue une très bonne alternative pour l'emploi de ces trousse commerciale non validées pour l'animal.

Mots clés : Progestérone, validation, trousse RIA, interférences, vaches.

Abstract

The competitive RIA radioimmunoassay technique is an immunological method recommended for the direct assay of progesterone. Due to its high sensitivity, specificity, reproducibility and ease for use, commercial radioimmunoassay kits have gained accreditation in the world of endocrinology. However, there are often many interferences in these assays, which can affect assay performance and lead to erroneous results.

In this study, we dealt with the impact generated on the analytical and clinical performances of the commercial RIA kit, validated for progesterone serum human tests, following its use for a direct assay of progesterone in cows' serum samples. We also compared the results of the clinical test obtained, with those after replacing the range of standards provided in the kit, by other ranges of standards prepared in a bovine serum matrix.

The results obtained show that the full use of the commercial kit in the assay of cow sera significantly affected the analytical (sensitivity, precision and accuracy) and clinical (progesterone concentrations at different physiological stages) performances of the commercial kit, particularly for the area of low concentrations. In addition, the substitution of the range of standards in the kit by a range of standards prepared in a buffer, calibrated and reconstituted in a depleted bovine serum, constitutes a very good alternative for the use of these commercial kits not validated for the animal.

Keywords: Progesterone, RIA Kit; validation, interference, cows.

ملخص

تقنية المقايسة المناعية الإشعاعية RIA, هي طريقة مناعية موصى بها للمقايسة المباشرة لهرمون البروجسترون اكتسبت مجموعات المقايسة المناعية الإشعاعية التجارية اعتماداً في عالم الغدد الصماء بسبب حساسيتها العالية وخصوصياتها وتنتاجيتها وسهولة استخدامها. ومع ذلك ، غالباً ما يكون هناك العديد من التداخلات في هذه المقايسات والتي يمكن أن تؤثر على أداء الفحص وتؤدي إلى نتائج خاطئة. تناولنا في هذه الدراسة التأثير الناتج عن الأداء التحليلي والسريري للعدة التجارية والتي تم التحقق من صحتها لاختبارات هرمون البروجسترون البشري بعد استخدامها لفحص مباشر لهرمون البروجسترون في عينات مصل البقر.

قمنا أيضاً بمقارنة نتائج الاختبار السريري الذي تم الحصول عليه ، مع تلك التي تم الحصول عليها بعد استبدال مجموعة المعايير المتوفرة في المجموعة ، بمجموعة من المعايير محضرة في مصفوفة مصل بقري. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الاستخدام الكامل للمجموعة التجارية في فحص مصل البقر أثر بشكل كبير على الأداء التحليلي (الحساسية والصحة والدقة) والسريري (تركيزات البروجسترون في المراحل الفسيولوجية المختلفة) للمجموعة التجارية ، وخاصة لمنطقة التركيزات المنخفضة. بالإضافة إلى ذلك، فإن استبدال مجموعة المعايير في المجموعة بمجموعة من المعايير المعدة في محلول منظم الفوسفات، والمعايرة وإعادة التكوين في مصل بقري مستنفذ، يشكل بديلاً جيداً جداً لاستخدام هذه المجموعات التجارية التي لم يتم التحقق من صحتها من أجل الحيوان.

كلمات المفتاح: البروجسترون, التحقق من صحة, عدة RIA, التداخلات, البقر.

Liste des tableaux

Tableau1:	Durées des différentes périodes du cycle sexuel chez la vache et moment de l'ovulation par rapport à l'œstrus.	5
Tableau 2:	Récapitulatif des principaux rôles hormonaux dans le cycle sexuel de la vache.	6
Tableau 3:	Paramètres de fécondité et de fertilité de quelques troupeaux algériens de vaches laitières.	10
Tableau 4:	Evaluation du niveau plasmatique de la progestérone (ng/ml) chez la vache au cours du cycle œstral.	13
Tableau 5:	Niveau de progestérone (ng/ml) dans le sang ou le lait écrémé en fonction de l'état physiologique de la femelle .	13
Tableau 6:	Récapitulatifs du Matériels et Réactifs utilisés.	27
Tableau 7:	Mode opératoire du dosage RIA progestérone de la trousse Immunotech sérum humain.	28
Tableau 8 :	Préparation des étalons progestérone par dilution dans une matrice tampon Phosphate.	31
Tableau 9a:	Résultats de reproductibilité intra essais de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins.	35
Tableau 9b:	Résultats de reproductibilité intra essais de la trousse RIA /progestérone Immunotech avec des sérums humains.	35

Tableau 10a:	Résultats de reproductibilité intéressais de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins.	36
Tableau 10b:	Résultats de reproductibilité intéressais de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums humains.	36
Tableau 11a:	Résultats de l'épreuve de dilution de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins.	37
Tableau 11b:	Résultats de l'épreuve de dilution de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums humains	38
Tableau 12a:	Résultats de l'épreuve de surcharge de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins.	40
Tableau 12b:	Résultats de l'épreuve de surcharge de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums humains.	40
Tableau 13:	Concentrations en progestérone des étalons préparés au laboratoire constitués dans trois différentes matrices.	42
Tableau 14:	Pourcentages de liaisons (B/Bo) correspondant à chaque étalon des gammes standards.	44
Tableau 15:	Paramètres de contrôle de qualité des gammes standards.	45

Liste des figures

Figure 1:	Cycle œstral chez la vache.	5
Figure 2:	Evolution de la concentration des hormones au cours du cycle (E2 :Oestradiol17 β ; INH : inhibine ; P4 : progestérone)	8
Figure 3:	Régulation neuro- endocrinienne du cycle sexuel de la vache.	9
Figure 4:	Structure moléculaire de la progestérone.	11
Figure 5:	Exemples typiques des profils progestéronimiques chez la vache.	14
Figure 6:	Interaction entre un antigène et différents anticorps.	16
Figure 7:	Schéma des liaisons entre un antigène et un anticorps.	16
Figure 8:	Complexes Antihènes –Anticorps .	18
Figure 9:	Méthode par compétition (RIA).	18
Figure 10:	Dosage non compétitif Immunométriques (IRMA) (technique sandwich).	19
Figure 11:	Les interférences matricielles en immunodosages.	24
Figure 12a:	Représentation graphique de l'épreuve de dilution avec des sérums bovins.	39
Figure 12b	Représentation graphique de l'épreuve de dilution avec des sérums humains.	39
Figure13:	Corrélation entre les concentrations en progestérone mesurées dans les étalons tampon phosphate et les valeurs calculées.	43
Figure14:	Evolution des concentrations en progestérone des étalons préparés reconstitués dans trois différentes matrices.	43
Figure15:	Courbes standards de dosage de la progestérone.	45
Figure 16a:	Taux progestéronémiques des sérums bovins (intervalle de concentrations 0-1 ng/ml).	46
Figure 16b:	Taux progestéronémiques des sérums bovins (intervalle de concentrations 1-6ng/ml).	47
Figure 16c:	Taux progestéronémiques des sérums bovins (intervalle de concentrations 6-21ng/ml)	47

Liste des abréviations

Ac: anticorps.

Ag*-Ac : complexes anticorps –antigène marqués.

Ag: antigène.

Ag-AC: complexe anticorps –antigène froid.

CBG: corticosteroid binding globulin.

CLIA : Chemiluminescence Immunoassay.

Cj: corps jaune.

Cpm : unité de mesure de la radioactivité (coups par minute).

CV: coefficient de variation.

E2:Oestradiol 17β .

EIA :Enzymoimmunoassay.

FIA :Fluoroimmunoassay.

FSH: Follicle Stimulating Hormone.

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone.

Ig: Immunoglobuline.

IHN: inhibine.

Int II-IF : Intervalle vêlage- 1 ère insemination fécondante.

Int V-II : Intervalle vêlage- 1ere insémination.

Int V-IF : Intervalle vêlage- insémination fécondante.

Int V-V :Intervalle vêlage –vêlage.

LDL :lipoproteins.

LH: Luteinizing Hormone.

P4:progestérone.

pgF2alpha: prostaglandine $F_{2\alpha}$.

RIA :Radio ImmunoAssay.

SDB:sérum bovin déplété.

TP: tampon phosphate.

Introduction

Introduction

La gestion de la reproduction est un objectif technique majeur dans un élevage laitier et constitue un atout primordial conditionnant sa rentabilité économique. Pour optimiser le potentiel reproductif d'un élevage, deux indicateurs essentiels sont à prendre en considération et à surveiller constamment, tant à l'échelle animale que troupeau, il s'agit de la fertilité et de la fécondité (**Zineddine et al., 2010**)

Pour pallier aux pertes engendrées par l'absence de la fécondation, la mortalité embryonnaire précoce ou toutes autres défaillances de la fonction de reproduction, divers moyens de diagnostic ont été mis au point. Parmi ces outils de diagnostic efficaces et modernes qui existent, le dosage de la progestérone dans le lait ou le sang des femelles, a montré son efficacité (**Thimonier, 2000**).

Ce stéroïde dont la variation de la concentration représente un bon bio indicateur de l'activité ovarienne chez la femelle, a permis d'affirmer nos connaissances dans le domaine de la physiologie de la reproduction et a contribué à mieux gérer les performances de la reproduction des troupeaux, à travers la détermination des périodes d'activité sexuelle des femelles, de caractériser les cycles ovariens et la détection du moment de l'œstrus et le diagnostic précoce de non gestation (**Thimonier, 2000**).

Les méthodes de dosage de la progestérone les plus utilisées sont les immunodosages. Elles regroupent l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène-anticorps. La nature des anticorps et leur liaison avec les antigènes étant bien caractérisées, cette réaction est devenue un outil performant d'exploration et de quantification. Le radioimmunodosage RIA de compétition ou par défaut d'anticorps est le seul qui est préconisé pour le dosage de la progestérone à cause de sa faible masse moléculaire.

De par leur haute sensibilité, spécificité, reproductibilité et facilité d'utilisation, les trousseaux commerciaux radioimmunologiques ont révolutionnés le monde de l'endocrinologie. Cependant, ces analyses restent sujettes à des interférences ou des effets de substance présente dans l'échantillon susceptible d'affecter l'obtention de la valeur correcte du résultat (**Schiettecatte et al., 2012**).

Parmi les interférences rencontrés lors du dosage immunologique, en plus de celles liées à l'anticorps (défauts de spécificité), nous avons l'effet matrice, conséquence d'une différence

de composition entre la matrice de la gamme des étalons et celle des échantillons à analyser (**Sapin, 2008**).

Or en Algérie, en raison de l'indisponibilité de trousse immunologiques de dosage de la progestérone dans le sérum ou le lait des animaux d'élevage, les utilisateurs au niveau des universités et du secteur de la production animale, par souci d'avancer dans leurs travaux, ont été très souvent contraint à utiliser les seules trousse disponibles sur le marché local, à savoir les trousse radioimmunologiques RIA/progestérone 'Immunotech', bien que celles-ci soient validées pour le sérum humain.

Pour cette raison et sachant au préalable les problèmes d'interférences qui peuvent surgir lors de l'utilisation de ce type de trousse pour le dosage de la progestérone dans les sérums d'animaux, nous avons initié cette première étude, dont l'objet est d'essayer d'évaluer l'impact d'un tel dosage sur l'exactitude des résultats obtenus.

Notre travail consistera dans une première partie, à réaliser une étude bibliographique portant sur des rappels en physiologie sexuelle de la vache, étayant les évènements ovariens et hormonaux du cycle de la vache, l'intérêt de doser la progestérone pour la détermination des stades physiologiques, à des fins de maîtrise de la reproduction ; L'immunodosage et le principe du dosage radioimmunologique de la progestérone, les critères d'une validation analytique et clinique d'une trousse immunologique et en abordera les problèmes d'interférences liées à l'immunodosage.

La seconde partie de notre manuscrit, qui est expérimentale, portera sur la validation de la trousse et consistera dans une première étape, en une évaluation des performances analytiques de la trousse commerciale RIA/progestérone 'Immunotech', pourvue d'une gamme d'étalons progestérone préparés dans une matrice sérique humaine, lors d'un dosage direct de la progestérone de sérums bovins.

Cette étape sera suivie d'une évaluation clinique, réalisée sur un lot d'échantillons de sérums bovins, à différents stades physiologiques. Ces échantillons seront dosés par cette trousse commerciale sans aucune modification. Aussi, ils subiront des lectures sur trois autres gammes d'étalons préparées au laboratoire, à savoir, une gamme tampon phosphate supplémentée de sérum bovin déplété et deux autres gammes constituées à 50% et 90% de sérum bovin déplété, en remplacement à la gamme d'étalons fournie dans la trousse RIA 'Immunotech' commerciale ; Une conclusion générale avec des perspectives vient clôturer ce travail.

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

I. Caractéristiques générales du cycle œstral de la vache

1. Définition

Le cycle œstral peut se définir comme l'ensemble des modifications cycliques d'ordre comportementales (éleveur), anatomiques (clinicien) et hormonales (laboratoire) que subit une génisse de manière régulière, dès la puberté, qui débute à l'âge de 6-18 mois. La durée du cycle chez la vache est en moyenne de 21 jours \pm 4 jours.

Les cycles œstraux peuvent s'interrompre en cas d'une gestation, en période post-partum (interruption de 3 à 6 semaines), en période de forte production laitière et en cas de pathologies (anœstrus permanent, carences alimentaires, etc.) (**Barbry, 2012**).

2. Les étapes du cycle

Le cycle œstral décrit la suite des événements qui se déroulent entre deux ovulations. On distingue deux phases (**Figure 1**).

2.1 La phase folliculaire

Elle comprend une période du cycle dite « pro-œstrus », ou précède « l'œstrus », durant laquelle a lieu la croissance folliculaire terminale et une période appelée « œstrus », correspondant à la fin de la maturation folliculaire et de l'ovulation. C'est au cours de cette période que la vache manifeste des chaleurs, qui sont le signe d'acceptation du mâle. (**DesCôteaux et Vaillancourt, 2012**).

2.2 La phase lutéale

Elle débute après l'ovulation et s'achève avec la régression du ou des corps jaunes (phases de metœstrus et de dioœstrus).

Au cours de la période « metœstrus », on assiste à la formation d'un corps jaune à partir du follicule qui a ovulé, suivi de la période « di-œstrus », durant laquelle le corps jaune formé croît et se maintient et s'achève, en l'absence de fécondation par une lutéolyse.

Dans ce cas le corps jaune régresse environ 17 jours après les chaleurs, les animaux retournent en pro-œstrus et un nouveau cycle débute. Le corps jaune peut se maintenir plus longtemps en cas de gestation (CJ gestatif) ou en cas de pathologies (CJ persistant).

Le tableau (**Tableau 1**) définit les durées des différentes périodes de chaque phase du cycle œstral chez la vache. (**DesCôteaux et Vaillancourt, 2012**).

Tableau 1 : Durées des différentes périodes du cycle sexuel chez la vache et moment de l'ovulation par rapport à l'œstrus (Barbry, 2012).

Espèce	Pro-œstrus	Œstrus	Metœstrus	Dicœstrus	Durée cycle	Moment de l'ovulation
Vache	2-3 jours	12-18 heures	2 jours	15 jours	21 jours	10-12 h post œstrus

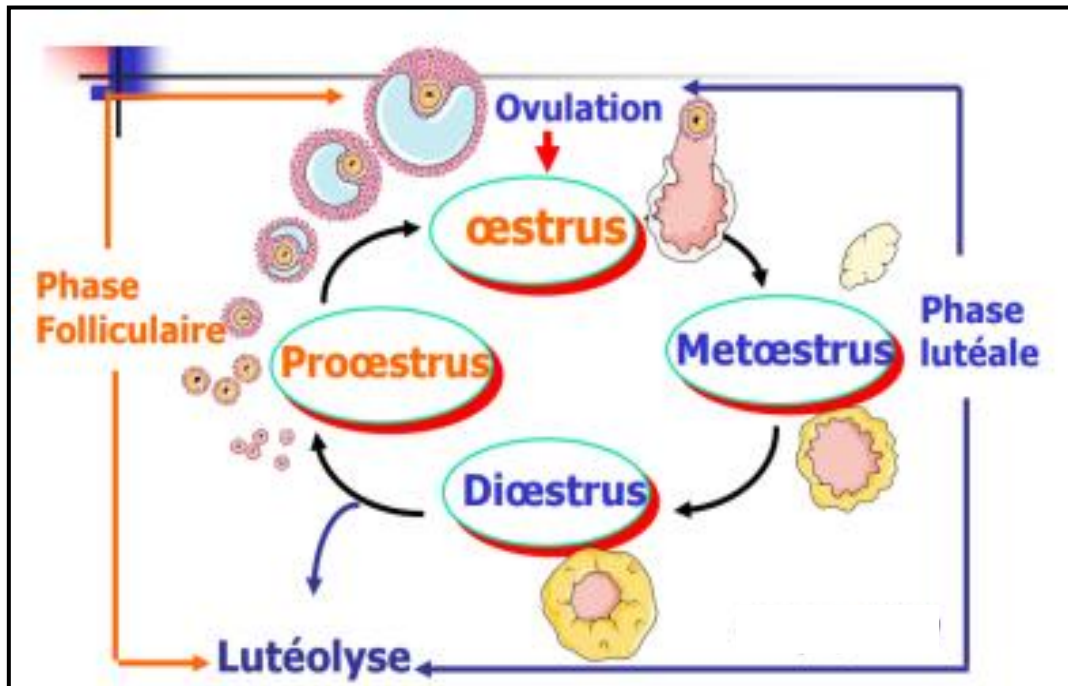


Figure1 : Cycle œstral chez la vache (Gayrard, 2007).

3. Changements hormonaux au cours du cycle sexuel

- Les hormones responsables :

La régulation du cycle sexuel est complexe. Elle est sous la dépendance hormonale qui fait intervenir le système nerveux central (axe hypothalamo-hypophysaire) et l'appareil génital (ovaires et utérus), qui interagissent entre eux (**Tableau2**) :

Tableau 2 : Récapitulatif des principaux rôles hormonaux dans le cycle sexuel de la Vache (**Bryner et al, 1990 ; Derivaux et Ectors,1980**).

Hormones	Organe de production	Principaux rôles
GnRH	hypothalamus	Stimule l'activité de l'hypophyse
FSH	hypophyse	Stimule la folliculogénèse Stimule l'apparition de récepteurs à la LH
LH	hypophyse	Maturation folliculaire Responsable de l'ovulation lutéinisation (Responsable de la transformation des cellules folliculaires en cellules lutéales)
Progestérone	Ovaire (corps jaune)	Bloque la cyclicité (rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus), pas d'ovulation possible Bloque les contractions utérines Prépare l'endomètre à la nidation Développement de la mamelle
Œstrogènes	Ovaire (follicule)	Comportement de chaleur Stimulation des contractions de l'utérus (meilleure diffusion de la semence lors de l'insémination)
PgF2alpha	utérus	Lyse du corps jaune de l'ovaire Stimulation des contractions de l'utérus
Inhibine	Ovaire (follicule tertiaire)	Inhibition de la production de la FSH

4. Mécanismes hormonaux de régulation du cycle

- Ce mécanisme est illustré par les **figures 2 et 3** :

En début de la phase lutéale, après l'ovulation du follicule dominant mure suite à une décharge de la LH, celle-ci assure la transformation de la thèque interne et de la granulosa du follicule en corps jaune (**Derivaux et Ectors,1980**).

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 secrétés (diœstrus), par rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, inhibent les sécrétions pré-ovulatoires de gonadotrophines (LH) (**Derivaux et Ectors,1980**).

Parallèlement, comme la croissance folliculaire est un phénomène continu, même pendant la gestation, toujours après l'ovulation, l'augmentation de la concentration en FSH stimule la croissance d'une vague folliculaire et augmente la capacité de liaison des cellules folliculaires vis-à-vis de la LH (**Saumande, 1991**).

Elle débute par le recrutement de follicules tertiaires sensibles à la FSH, c'est à dire possédant des récepteurs à la FSH. Sous l'action de la FSH qui stimule la conversion d'androgènes en œstrogènes, en association avec la LH, les follicules recrutés produisent de l'œstradiol et de l'inhibine (**Drion et al., 1996**).

Les concentrations de ces deux hormones augmentent progressivement tout au long de la vague folliculaire avec l'augmentation de la taille des follicules qui les produisent pour exercer un rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire, qui induit une diminution de la FSH circulante (**Drion et al., 1996**).

La concentration en FSH devenue insuffisante pour assurer le développement de tous les follicules recrutés, seul le follicule dominant, qui possède des récepteurs LH pourra subsister. Ce dernier, contrairement aux autres follicules, passera d'un statut FSH-dépendant à un statut LH-dépendant et poursuivra ainsi sa croissance et sa maturation grâce à la LH produite (**Drion et al., 1996**).

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 (maintien le rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus), 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 (**Drion et al., 1996**).

Les concentrations plasmatiques en oestrogènes 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 (régression du CJ du cycle précédent), 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 (**Drion et al., 1996**).

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 (**Peters et Ball, 1995**).

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 (lutéale) 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 (**Peters et Ball, 1995**).

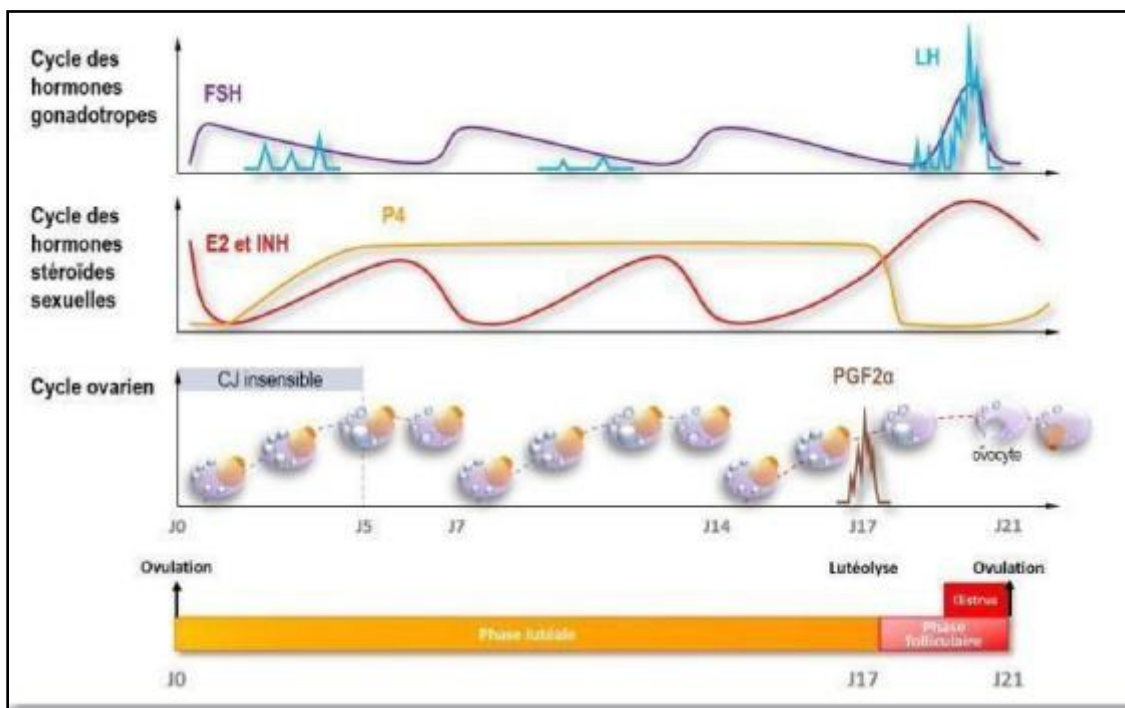


Figure 2 : Evolution de la concentration des hormones au cours du cycle (E2 : Oestradiol 17 β ; INH : inhibine ; P4 : progestérone) (**Mauffré et al., 2016**)

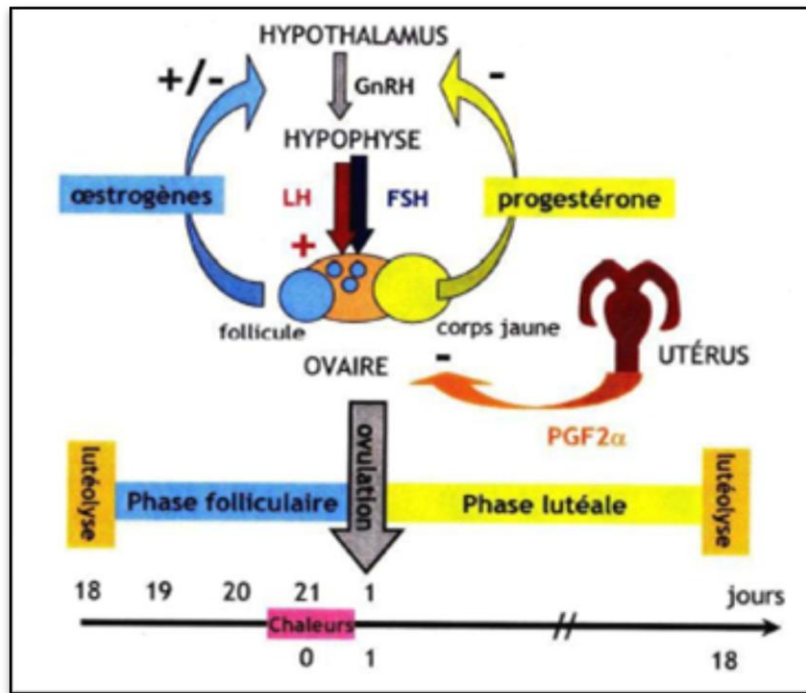


Figure 3 : Régulation neuro- endocrinienne du cycle sexuel de la vache (UNCEIA, 2006).

5. La gestation

La gestation commence avec la fixation de l'œuf dans l'endomètre et se termine par la parturition. La durée de gestation varie de 275 à 290 jours (DesCôteaux et Vaillancourt, 2012). Elle commence par la période embryonnaire définie comme la période comprise entre la fécondation et la fin de l'organogenèse (au environ du 42ième jour de gestation) et elle est suivi par la période fœtale. Sur le plan hormonal, le maintien de la gestation est assuré par la persistance du corps jaune lutéale en gestatif et la production de progestérone en quantité plus élevée. Le placenta constitue organe endocrine transitoire qui produit un grand nombre d'hormones, dont les hormones stéroïdiennes (progestérones, œstrogènes) et des hormones protéiques (hormones lactogène placentaire, protéines spécifiques de la gestation), ainsi que des facteurs de croissance (Paul et al., 2012).

6. L'activité ovarienne post-partum

La période immédiate après le vêlage est suivie d'une inactivité ovarienne (absence d'ovulation). Cette inactivité est liée aux taux élevés d'œstrogènes fœtaux et de progestérone maternelle secrétés avant le vêlage, qui inhibent la sécrétion de LH et de FSH par l'axe hypothalamo-hypophysaire réduisant l'activité ovarienne (Grimard et Disenhaus, 2005).

Cette infertilité est liée à involution utérine, cycles œstraux courts, absence ou insuffisance du développement folliculaire (Short et al., 1990).

II. Gestion de la fonction de reproduction

Bien gérer ou maîtriser la reproduction d'un élevage laitier, représente la clé de la réussite de ce dernier. Cette maîtrise consiste en l'application de techniques qui visent à réduire au maximum la période improductive des vaches, faciliter et mieux organiser les différentes tâches liées à la gestion de l'élevage et veiller à la bonne prophylaxie des animaux.

Or, l'évaluation de certains paramètres de reproduction (fertilité et prolificité) de certains élevages laitiers Algériens, montrent malheureusement des performances très au-deçà des seuils espérés, qui sont relatives à une gestion aléatoire et défectueuse de la reproduction (mauvaise détection des chaleurs, les moments d'insémination et de saillie inopportuns, le non prise en charge des cas d'infertilité et autres) (Bouzebda et al 2008).

Tableau 3 : Paramètres de fécondité et de fertilité de quelques troupeaux algériens des vaches laitières.

Auteurs	Miroud et al., 2014	Saidi et al., 2012	Zineddine et al., 2010	Bouzebda et al., 2008	Normes : Hanzen et al (1990)
Régions d'Algérie	Nord-est	Centre	Ouest	Est	
<u>Paramètres de reproduction</u>					
<i>Critères de fécondité (j) :</i>					
Int V-V	430 ± 75	461± 16,1	470±111	434-461	365-385
Int V-I1	72,3 ±24,8	106± 85,4	159±89	96-66.5	60-65
Int V-IF	148 ± 96,2	185± 137	193 ± 108	164-181	85
Int I1-IF	69 ± 50,4	79	32±66	68-114.5	23-30
<i>Critères de fertilité (%) :</i>					
Taux de réussite en I1	25	41,1	67	47.16-23.05	>60
Taux vaches à + de 3 I	43,5	39,3	6	20.46-42.96	<15

Pour remédier à cette situation, des techniques modernes de gestion et de maîtrise de la reproduction, à savoir l'insémination artificiel, le transfère embryonnaire, la maîtrise et

l'induction hormonale des cycles sexuels, ont été mises au point pour aider aussi bien l'éleveur que le vétérinaire à mieux gérer la fonction de reproduction de ce potentiel animal et à augmenter sa rentabilité (Zineddine *et al.*, 2010) .

Cependant, l'utilisation efficace de toutes ces techniques, requiert au préalable, la connaissance de l'activité ovarienne des vaches et la détermination exacte de leur stade physiologique.

Parmi les moyens existant de détermination de l'activité ovarienne, en plus d'observer directement l'état des ovaires par les différentes techniques connues des vétérinaires, le dosage des hormones stéroïdes, telles que la progestérone (Mann *et al.*, 2005) et les œstrogènes (Kiyoshi *et al.*, 2001) et certaines glycoprotéines telles que les protéines spécifiques ou associées à la gestation (Shahim, 2013) et le suivi de leur évolution, permettent de déterminer l'activité ovarienne et placentaire.

III. Détermination de l'état physiologique de la vache par le dosage de la Progestérone

1. Structure de la progestérone :

- Propriété biologique et physique

La progestérone, appelée **4 pregnène 3,20-dione**, est une hormone stéroïdienne à **21** atomes de carbone, de formule $C_{21}H_{30}O_2$ (Figure 4).

C'est une substance cristalline, incolore, sa masse moléculaire est de **314,46g/mol** et sa demi-vie est de dix à 15 minutes (Taieb, 2011). La progestérone est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans certains solvants organiques (Edqvist, 1993). Elle possède une bande d'absorption dans l'ultraviolet, avec un pic d'absorption situé à **240 nm** et une fluorescence en milieu alcalin (Gabeur, 1989).

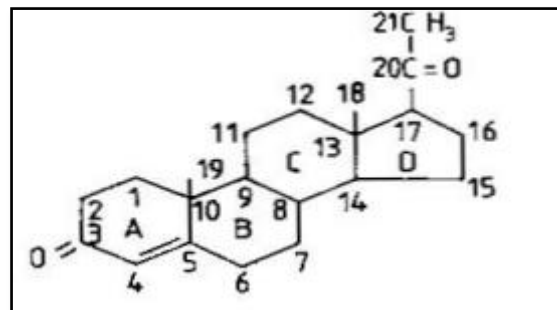


Figure. 4: Structure moléculaire de la progestérone (Bensegueni, 2006).

- **Biosynthèse**

La progestérone est synthétisée à partir du cholestérol (C27), fourni par les lipoprotéines (LDL). Elle est un précurseur jouant le rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse des estrogènes et des corticoïdes (**Taieb et Lachgar-Keltoum, 2011**).

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 (**Bayard, 1981**).

- **Transport**

La progestérone est une structure apolaire, elle est par conséquent toujours sous forme liée. Dans le sang, la progestérone est transportée liée à la corticosteroid binding globulin (CBG) et l'albumine (approximativement 98%) et sous la forme libre (**Wood et Gower, 2010**).

- **Catabolisme et Elimination**

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 (**Borel et al., 1997**).

2. Evolution de la progestérone au cours d'un cycle sexuel de la vache :

L'évolution progestéronémique au cours du cycle œstral est témoin de l'activité sexuelle. Elle reflète assez bien les périodes sécrétrices et l'involution du corps jaune (**Yenikoye et al., 1981**).

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 metœstrus, pour atteindre un plateau, qui persiste pendant le stade diœstrus de la phase lutéale. 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 (**Thimonier, 2000**).

Le tableau 4, illustre la variation du taux de progestérone telle qu'elle est rapportée par (**Meyer et Yesso, 1991**).

Tableau. 4 : Evaluation du niveau plasmatique de la progestérone (ng/ml) chez la vache au cours du cycle œstral (**Meyer et Yesso, 1991**).

Jours du cycle	J0	J8/J9	J15-J17	J20
Taux de progestérone	0.6	1-1.4	9.5±0.4	<1

Quant aux seuils en progestérone dans le sang et le lait écrémé de référence, déterminant les différents états physiologiques des femelles, ils sont illustrés par le **tableau5**. Ils sont communs à toutes les bibliographies.

Tableau 5 : Niveau de progestérone (ng/ml) dans le sang ou le lait écrémé en fonction de l'état physiologique de la femelle (**Thimonier, 2000**).

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

Les concentrations de progestérone mesurées dans le sang reflètent fortement celles mesurées dans le lait écrémé (**Meisterling et Dailey, 1987**) ($r=0.95$). Cependant, étant donné sa nature lipophile, la progestérone est présente en concentration plus élevée dans le lait entier par rapport au lait écrémé (**Meurant, 1995**).

3. Intérêt du dosage de la progestérone chez les femelles d'élevage

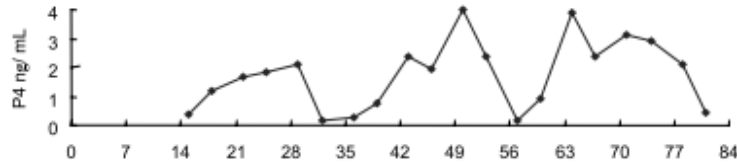
La progestérone est une hormone dite de la reproduction. Sa variation chronologique au cours du cycle œstral, a fait de son dosage un outil fiable de suivi et de détermination du statut physiologique des femelles d'élevage (**figures 5**). Elle peut être dosée dans plusieurs milieux biologiques (**Gröschl, 2009**).

Cependant en médecine vétérinaire, le sang et le lait 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 du prélèvement qui n'engendre aucun stress à l'animal. Quant au choix judicieux du nombre de prélèvements et de leurs intervalles, il détermine l'état physiologique de la femelle prélevée (**Thimonier, 2000**).

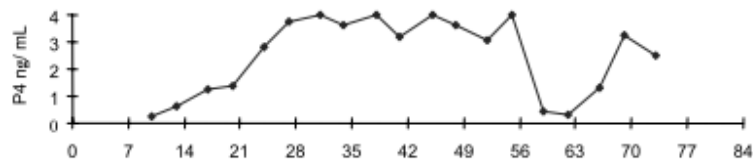
- pour étudier la cyclicité des femelles pendant les saisons (**Christensen et al., 2014**)
- déterminer l'entrée en puberté des jeunes femelles (**Yu et Li, 2001**)

- la mise en évidence d'une activité ovarienne chez les femelles cyclées (Banu et al., 2012)
- suivi de la reprise de l'activité ovarienne postpartum (Mmbengwa et al., 2009)
- appuis pour l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire (Szelényi et al., 2015)
- diagnostic précoce de non gestation et suivi de la gestation (Regal et al., 2012)
- évaluation de l'efficacité des traitements hormonaux (Bisinotto et al., 2015)

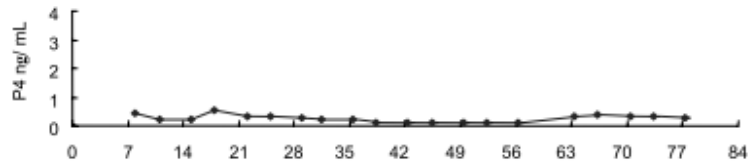
Cyclicité ovarienne normale



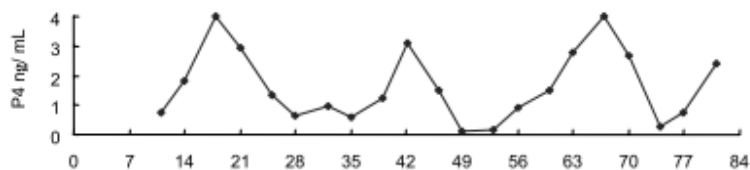
Phase lutéale prolongée (corps jaune persistant)



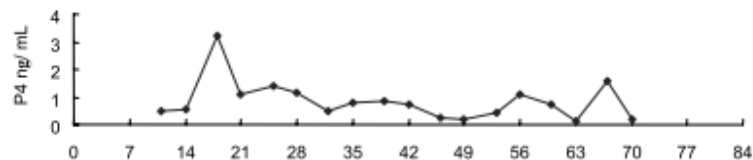
Inactivité ovarienne (anoestrus)



Phases lutéales courtes (cycles courts)



Cessation de la cyclicité



Jours post-partum

Figure 5 : Exemples typiques des profils progestéronimiques chez la vache. (Shrestha et al., 2004)

IV. Les techniques de dosage de la progestérone

1. Les dosages immunologiques

Depuis 1960, l'immunoanalyse par sa sensibilité, sa spécificité et sa praticabilité supérieures à celles des méthodes chimiques ou biologiques, a révolutionné l'endocrinologie (**Sapin, 2008**). Elle fait partie des outils analytiques les plus performants mis à la disposition du biologiste. Elle permet la détection et la quantification des molécules d'intérêt biologique (hormones, marqueurs tumoraux ou métaboliques, médicaments,...) dans le diagnostic et les suivis des maladies (**Cohen, 2006**).

Sa première utilisation remonte à la mise au point, en 1953, par les chercheurs (**Yalow et Berson, 1959**), de l'immunodosage avec marqueur, utilisant un radio-isotope, le dosage radio-immunologique par compétition pour le dosage de l'insuline.

Par la suite, les contraintes engendrées par l'utilisation de radioéléments ont poussé les scientifiques, à rechercher l'utilisation d'autres marqueurs non radioactifs. Le commencement des années 1980, a vu apparaître des trousse d'immunoanalyses (réactifs prêts à l'emploi), utilisées d'abord manuellement puis sur automates (**Bador et al., 1992**), utilisant comme marqueurs, les enzymes (EIA) (**Colazo et al., 2008**), la fluorescence (FIA) (**Oku et al., 2011**) et la chimiluminescence (CLIA) (**Lee et al., 2010**).

Malgré tout, les dosages RIA restent encore les plus utilisés pour des raisons de coût et de simplicité (**Benoist et al., 2011**).

2. Bases physico-chimiques du système antigène-anticorps

Les techniques immunologiques sont basées sur la formation de complexes antigènes anticorps (**figure 6**). Le premier élément clé des immunodosages est l'anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig). Ces glycoprotéines sont les récepteurs d'antigène, dont le site de liaison à l'épitope s'appelle le paratope (**Barbier, 1989a**)

Les antigènes sont des molécules complexes (naturelles ou synthétiques), pouvant être de nature protéique ou non unitaire, complets, pouvant stimuler la production des anticorps spécifiques (immunogénicité) et interagir avec ces derniers (réactivité) ou incomplets, de faible poids moléculaire, comme les haptènes (**Béné et al 2014**)

Ces dernières 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 (**Latapie, 1989**).

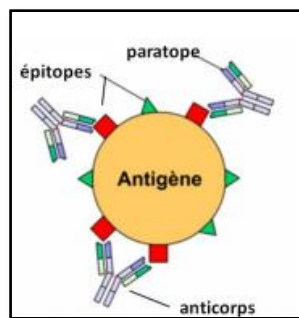


Figure 6 : Interaction entre un antigène et différents anticorps (WIKIPEDIA).

Le système antigène-anticorps obéit aux mêmes principes de l'interaction ligand-récepteur. Il est caractérisé par la capacité de liaison réversible, par conséquent, non covalentes et de faible énergie (varie entre 4 et 30 kJ/mol). Ces forces mises en jeu entre les acides aminés des anticorps et de l'antigène sont de quatre types : hydrogènes, hydrophobes, de Van der Waals, ou ioniques (**Figure 7**) (**Barbier, 1989b**)

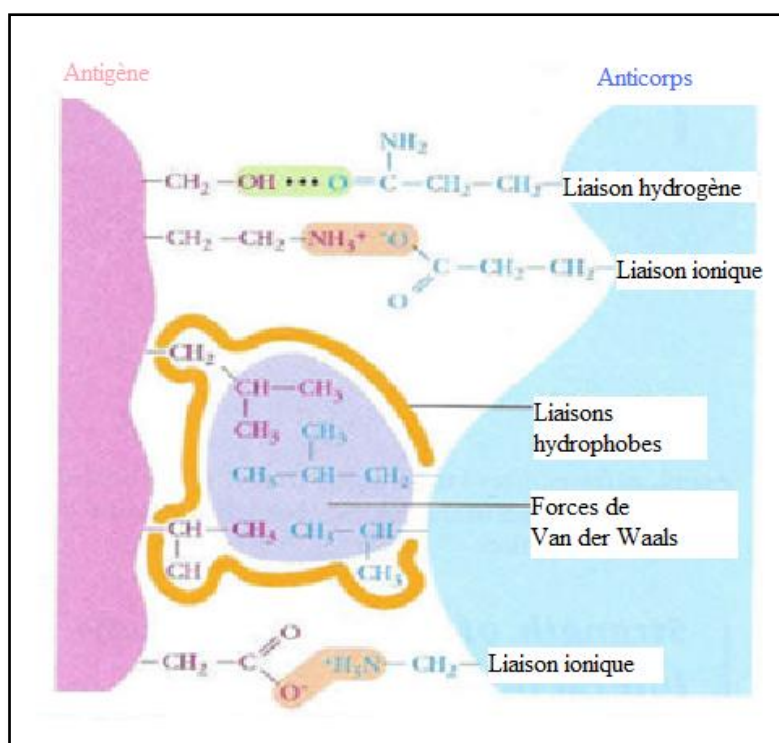
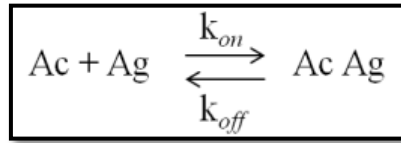


Figure.7 : Schéma des liaisons entre un antigène et un anticorps (**Goldsby et al 2000**)

La stabilité de toutes ces liaisons non covalentes est influencée, du point de vue thermodynamique, par la force de liaison entre l'épitope et son paratope (l'affinité et la spécificité de l'Ac pour Ag), la concentration de ces deux entités et par les conditions physico-chimiques du milieu réactionnel (**Barbier, 1989b**).

L'affinité de l'interaction peut être caractérisée quantitativement par la constante d'affinité K_a (constante à l'équilibre, en M^{-1}), dont l'écriture découle d'un équilibre réactionnel :



k_{on} : constante de vitesse d'association, k_{off} : constante de vitesse de dissociation.

La constante d'affinité K_a d'un site de liaison pour un site antigénique est définie par les relations :

$$K_a = \frac{[\text{Ac}][\text{Ag}]}{[\text{Ag - Ac}]} \quad K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

Cette affinité sera d'autant meilleure que les interactions au niveau moléculaire seront nombreuses et que leur agencement spatial sera le plus approprié pour assurer une parfaite complémentarité entre l'antigène et l'anticorps (modèle de la clé dans la serrure), donc une meilleure stabilité (**Barbier, 1989b**)

Les facteurs essentiels qui influencent ces liaisons sont ceux que l'on retrouve de manière générale pour toutes les interactions entre protéines ou entre protéines et ligands. Citons, en particulier, une forte influence du pH, de la concentration ionique, et des solvants qui perturbent les sphères de solvation et déstabilisent les liaisons hydrogènes. (**Bornet et Charrie, 1998**). On considère généralement qu'un anticorps possède une bonne affinité pour un antigène lorsque son K_a est supérieur ou égal à $10^9 M^{-1}$ (**Barbier, 1989b**)

La spécificité d'un anticorps correspond à la capacité des anticorps à sélectionner entre des espèces chimiques proches (**Janin, 1995**). Idéalement, un anticorps « spécifique » ne formerait des complexes stables qu'avec le seul antigène contre lequel il a été produit. Toutefois, il existe toujours des « réactions croisées », l'anticorps reconnaissant avec des affinités plus ou moins fortes des antigènes analogues, de structure plus ou moins semblable à celle de l'antigène de référence (**Latapie, 1989**)

3. Le Radioimmunos dosage (RIA) « Radio ImmunoAssay »

3.1 Principe des techniques

Lorsque on met en présence d'un anticorps (Ac) son antigène (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 8**)

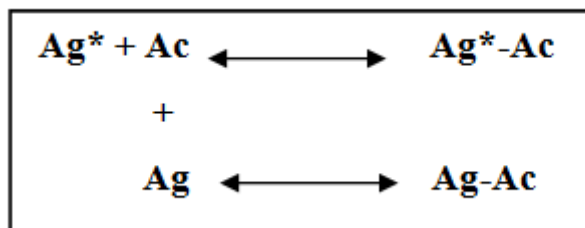


Figure 8 : Les complexes Antigènes-Anticorps

En radioimmunos dosage, selon la présence de l'anticorps en quantité déficitaire ou en excès, on parle respectivement, de radioimmunos dosages par compétition (RIA de compétition) et de radioimmunos dosages non compétitifs ou Immunométriques (IRMA : Immuno Radio Metric Assays) (Bourel et Courrière, 2003).

Ces dosages se réfèrent à une gamme d'étalonnage établie à l'aide de cinq ou six étalons ou standards de concentration connue en analyte à quantifier dans la matrice. La courbe d'étalonnage décrivant la relation entre la concentration de l'analyte et la réponse doit être décrite par le modèle mathématique le plus simple possible (relation linéaire pondérée ou non pondérée ; quadratique ; log-linéaire....) (Nicolas et al., 2004).

Les principes de ces deux dosages sont schématisés sur les Figure 9 et Figure 10.

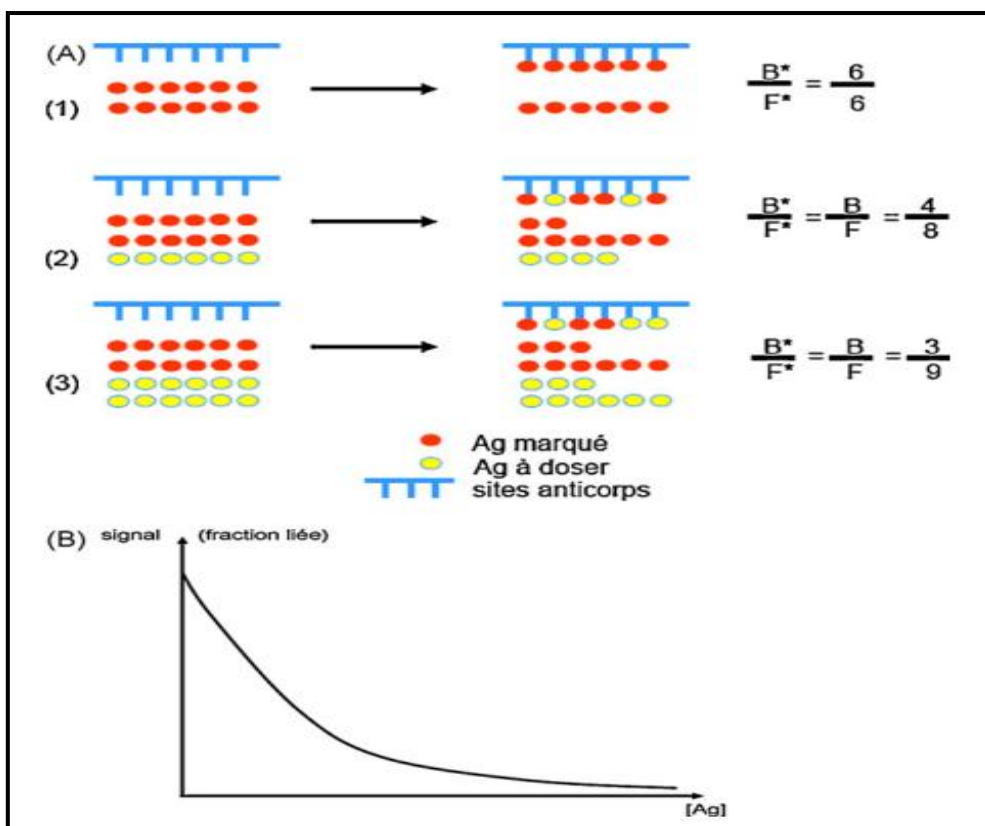


Figure 9 : Méthode par compétition (RIA) (Bador et al., 1992).

A : Représentation schématique de la compétition entre l'antigène (étalon ou échantillon) et l'antigène marqué vis-à-vis des sites anticorps en déficit : (1) en l'absence d'antigène à doser, (2) et (3) en présence de quantités croissantes d'antigène à doser. B* : concentration de l'antigène marqué lié à l'anticorps. F* : concentration de l'antigène marqué libre. B : concentration de l'antigène lié à l'anticorps. F : concentration de l'antigène libre.

B : Représentation schématique d'une courbe d'étalonnage. La valeur portée en ordonnée est l'intensité du signal (absorbance, nombre d'impulsions...) correspondant à la concentration d'antigène marqué lié (B*) en fonction de la concentration en antigène non marqué, une relation inversement proportionnelle entre le pourcentage de liaison Ag-Ac et la quantité d'antigène (Bador et al., 1992).

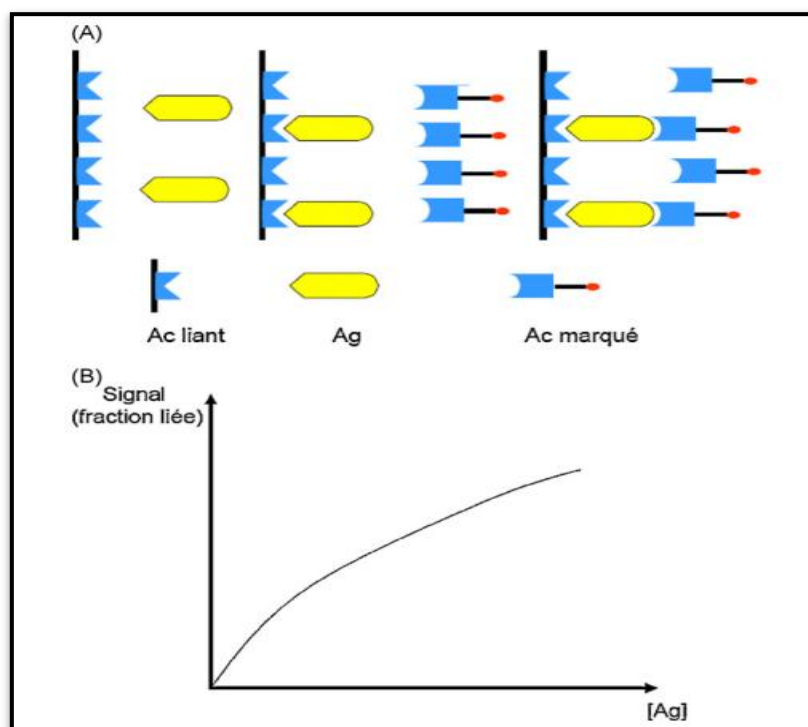


Figure 10: Dosage non compétitif Immunométrique (IRMA) (technique sandwich) (Bador et al., 1992).

A : principe de la méthode.

B : représentation schématique d'une courbe d'étalonnage.

Le principe du dosage par compétition est une compétition entre les deux formes de l'antigène (froid Ag et marqué Ag*) pour un nombre limité de site d'anticorps spécifiques fixés sur une phase solide. Ces dosages utilisent un seul anticorps, le plus souvent polyclonal. Le maintien de la concentration en anticorps et en molécule marquée fixe et l'augmentation de la concentration en antigène froid, entraîne l'augmentation de la

concentration en complexe antigène-anticorps, au détriment de la formation du complexe (antigène marqué – anticorps).

Après la séparation des composés libres des complexés, sans modifier l'équilibre de la réaction, le signal émis par la fraction liée est mesuré et on procède à l'établissement d'une courbe d'étalonnage à l'aide des concentrations des solutions étalons. Les concentrations des échantillons inconnus et des contrôles sont déterminées par extrapolation sur la courbe d'étalonnage .

Le principal avantage de cette méthode par compétition est qu'elle peut être appliquée à tous types d'antigènes, quelle que soit leur taille (cas des haptènes à un seul épitope : hormones thyroïdiennes et les stéroïdes). Cependant, une bonne sensibilité et une bonne précision de la technique nécessitent une constante d'affinité élevée de l'anticorps pour son antigène et un traceur doté d'une haute activité spécifique (**Barbier, 1989a**).

Un deuxième élément limitant pour cette méthode à un seul site de liaison concerne les métabolites et les interférents, qui sont susceptibles d'être liés à l'anticorps, et donc de générer un signal qui surestime la quantité d'antigène. Ce manque de spécificité est réduit dans les méthodes Immunométriques à deux sites, comme par exemple les méthodes de type sandwich (**Dubois, 2008**).

Les dosages radioimmunométriques ou dosages sandwich (IRMA) sont destinés pour les analytes de masse molaire élevée (TSH, LH, FSH, prolactine, et autres) et le traceur, correspond à un anticorps marqué. L'analyte est reconnu, puis pris en sandwich par une paire d'anticorps spécifiques, présent en excès par rapport à l'Ag, dont l'un est marqué (traceur) et l'autre est fixé sur une phase solide. Après séparation des fractions libre et liée, le signal émis par le traceur lié à la phase solide est mesuré. Il augmente avec la concentration de l'analyte.

Les avantages de cette technique sont liés à la fois à l'utilisation d'anticorps monoclonaux et au principe même de la méthode (sandwich), ce qui augmente la spécificité du dosage et baisse la limite de détection par rapport aux dosages par compétition (**Ekins, 1993 ; Massart, 2009**).

3.2. Composition d'une trousse de radioimmunodosage

Tous les réactifs nécessaires à l'exécution d'un dosage RIA sont fournis sous la forme d'un Kit ou trousse. Une trousse destinée au dosage radioimmunologique d'une molécule biologique ou autre est composée essentiellement de produits prêts à l'emploi soit sous formes de solutés ou lyophilisés. Ces produits fournis sont représentés par :

1 -L'anticorps assurant un maximum de spécificité à la réaction. Il est livré fixé à une matrice solide (tubes), près à l'emploi dans le cas d'une trousse RIA solide.

2 -Le traceur ou l'Ag marqué à l'iode radioactif (I^{125}), ayant une totale identité avec l'étalon ou l'analyte.

3-Les standards ou étalons sont représentés par Ag froids, fournis à des concentrations croissantes (gamme d'étalonnage), pour la réalisation d'une courbe d'étalonnage,

4 -Des étalons internes ou échantillons de contrôle, présentant des valeurs de concentrations situées dans une fourchette déterminée par le fournisseur.

Les étalons doivent être disponibles dans le temps et leur concentration doit rester stable au cours de leur conservation, pour cela ils sont traités (bactériostatiques, anti protéases...), répartis en aliquotes, lyophilisés, scellés et conservés à très basse température (**Massart, 2009**).

3.3. Validation d'une trousse radioimmunologique

Le terme validation selon la littérature fait référence à une vérification ou une caractérisation (**Feinberg , 2012**).

La validation d'une méthode en bioanalyse comprend une succession de procédures afin de démontrer que la méthode utilisée permet de quantifier un analyte dans une matrice particulière pour une application précise. Différents paramètres permettent de définir l'acceptation d'une méthode analytique : l'exactitude, la précision (répétabilité, la reproductibilité), la sélectivité et la spécificité, la robustesse et enfin la stabilité de l'analyte au cours des différentes étapes de prétraitement et dans la matrice de dosage.

Cette 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 (**Bourrel et Courrière,2003**).

3.3.1. 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 signal. La limite de détection se détermine par la répétabilité intra-essai du standard zéro (matrice dépourvue de l'analyte) et se calcule par la moyenne en CPM $B_0 \pm 3$ écarts-type (exprimé en concentration) (**FAO/AIEA, 1997, Bourrel et Courrière, 2003 ; Digeon, 2005**).

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 (**Bourrel et Courrière, 2003**).

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 (**Bourrel et Courrière, 2003**)

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 (**Bourrel et Courrière, 2003**)

Ce test permet de mettre en évidence l'existence d'une erreur systématique. Elle correspond au pourcentage retrouvé par rapport à la concentration théorique : (concentration recalculée / concentration théorique) x100. L'exactitude doit être comprise entre 85 et 115 % (**Nicolas et al., 2004**).

- 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 $y = a x$, « a » étant la pente, égale à la concentration initiale . (**Bourrel et Courrière, 2003**)

- Test de surcharge

Il permet de vérifier que l'analyte est dosé en totalité dans le milieu réactionnel biologique (sérum ou autre) et cela quelle 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) (**Beaudonnet et Cohen, 1994**).

3.3.2. Evaluation clinique de la trousse

L'évaluation clinique d'une trousse développée, consiste à comparer les valeurs des concentrations de l'analyte dosé dans d'un lot d'échantillons correspondant à différents stades physiologiques, par la trousse testée et par une autre trousse commerciale de même type ou autres (trousses immunologiques ou techniques connexes), validées.

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.

4. Les interférences en immunodosages

L'interférence en immunodosage est définie comme étant l'effet de substances présentes dans l'échantillon susceptible d'affecter l'obtention de la valeur correcte du résultat en un analyte, généralement exprimé en concentration ou en activité (**Schiettecatte et al., 2012**). Ces interférences peuvent augmenter (interférence positive) ou diminuer (interférence négative) le résultat mesuré (**Figure 11**).

Elles se distinguent par des interférences dites dépendantes ou indépendantes de l'analyte (**Sapin, 2008 ; schwickact et al., 2014, Gace et al., 2015**).

Les interférences dépendantes regroupent tous les facteurs capables d'affecter directement la détection de l'analyte, en premier ceux liés à l'anticorps tels que : le défaut ou l'excès de spécificité de l'anticorps utilisé, la présence d'anticorps antihormone chez les sujets présentant des maladies auto-immunes, d'anticorps hétérophiles et d'anticorps anti-animal et la présence de facteurs rhumatoïdes et d'autres protéines. Les interférences indépendantes de l'analyte, concernent les interférences pouvant générer des signaux en absence de l'analyte ou inhiber directement les réactifs du test (**Sapin, 2008 ; schwickact et al., 2014, Gace et al., 2015**).

Il s'agit notamment des lipides, la force ionique, le pH, les cations, la viscosité, les protéines sériques, les anticoagulants, les protéases, les protéines de liaison, de l'hémolyse, d'ictère, de lipémie, de l'effet des anticoagulants, du stockage simple des échantillons et de l'effet crochet (présence excessive en analyte/à l'anticorps en IRMA) (**Burhol, 1984 ; Tate, 2004**). L'importance de l'interférence dépend de la concentration en facteur interférent dans le sérum, mais il n'est pas nécessairement directement proportionnel (**Tate, 2004**).

Le dosage de molécules de faible masse moléculaire (stéroïdes) est particulièrement sensible aux effets de matrice (Beaudonnet et Cohen, 1994). Quant à la présence d'interférences lors d'un immunotest, elle est généralement révélée par le test d'exactitude, à savoir le test de dilution et le test de surcharge (Beaudonnet et Cohen, 1994).

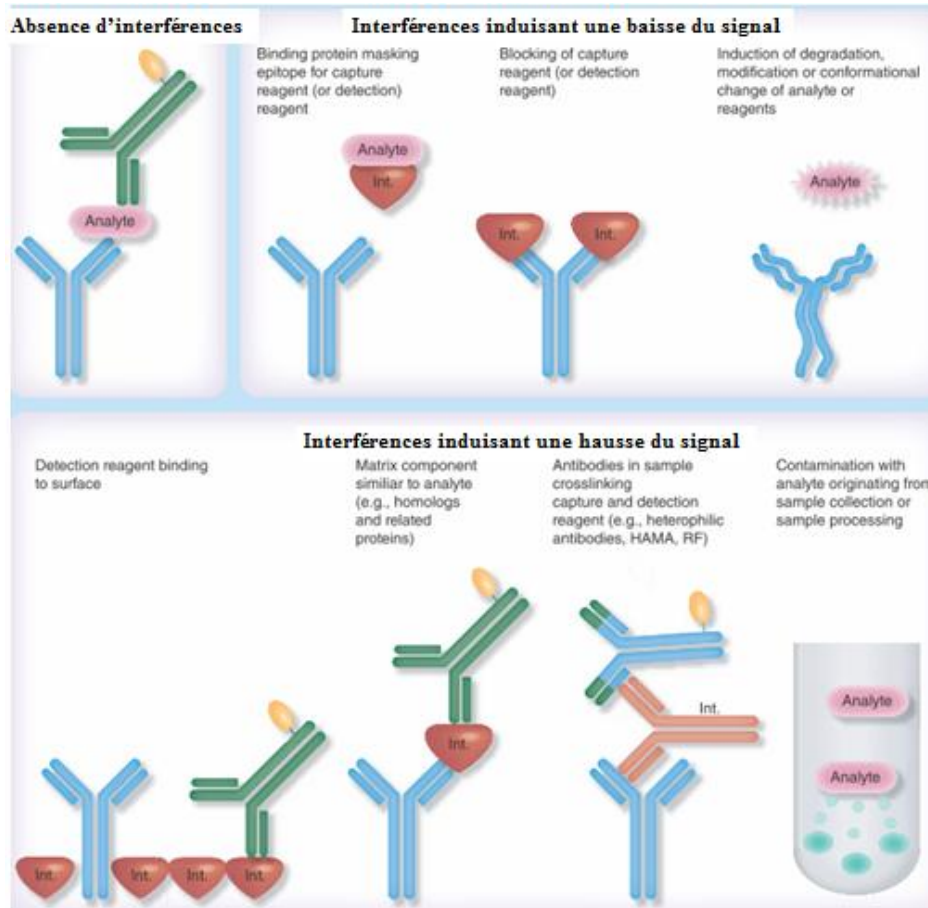


Figure 11 : Les interférences matricielles en immunodosages (Schwickact et al., 2014)

HAMA: Human antimouse antibodies (anticorps humains antisouris);

Int.: Interfering molecule (molécules interférentes);

RF: Rheumatoid factor (facteurs rhumatoïdes).

Quant à l'étalon, il doit présenter une structure identique ou le 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 (Guéris et Ferrière, 1989).

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 (**Barbier, 1989c**).

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 soit par immunodosages ; par l'utilisation d'une trousse commerciale ; pour le même analyte ; ou par l'utilisation d'une technique connexe validée (**Barbier, 1989c**). .

De grands efforts ont été déployés pour optimiser les méthodes analytiques en utilisant des étalons appropriés pour éliminer ou réduire les effets de matrice. Pour compenser ces dernières, les courbes d'étalonnage sont soit enrichies par une matrice d'échantillon ou préparées dans une matrice neutre, tel que le tampon phosphate (**Chiu, 2010 ; Lupi-chen et al.,1999**)

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériels et Réactifs

Les matériels et les réactifs utilisés lors de l'exécution de cette étude sont consignés dans le **tableau 6**.

Tableaux 6 : Récapitulatifs du Matériels et Réactifs utilisés.

Matériels	Réactifs
Préparation des étalons progestérone tampon phosphate	
<ul style="list-style-type: none"> -Balance (Sartorius Basic) -Plaque chauffante +agitateur (IKA RET basic) -pH-mètre (HANNA instruments) -Lyophilisateur (Christ alpha 1-2) - Flacons pénicilline+bouchons+capsules -Verrerie de laboratoire propre (béchers, fioles) - barreaux magnétiques - Micropipettes (Eppendorf) - Tubes en PVC -Centrifugeuse réfrigérée JOUAN -Vortex (genie2SCIENTIFIQUE INDUSTRIE) 	<ul style="list-style-type: none"> -Hydrogénophosphate di sodique anhydre (71639, FLUKA, Na₂HPO₄, Mr 141.96, >99.5%) -Dihydrogénophosphate de sodium dihydrate (71505, FLUKA, NaH₂PO₄, 2H₂O, Mr >99%) -Hydroxyde de sodium (71691, FLUKA, NaOH, Mr 40.00, >98%) -Hydroxyde de sodium NaOH 6N (Fluka) -Eau distillée stérile -Acide Chlorhydrique HCl pure 37% (CARLO ERBA) - Ethanol 99,5% - Progestérone de pureté 99% (P0130, MW : 314,47) -Azide de sodium NaN₃ (conservateur), fourni par Sigma (25g) - Charbon actif
Dosage de la progestérone (calibration des étalons et validation de la trousse)	
<ul style="list-style-type: none"> Micropipettes (Eppendorf) Compteur à scintillation gamma Agitateur rotatif Tubes en PVC 	<ul style="list-style-type: none"> -Trousse radioimmunologiques (RIA), de dosage sérique de la progestérone humaine (IM1188) acquises auprès d'Immunotech (Beckman Coulter).

2. Le tampon phosphate (TP) à 0.5M, pH 7.4

Procédé de préparation d'un volume de 500mL

Faire dissoudre dans un bécher de 500mL, 24.843g de Na_2HPO_4 et 11.70g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 300mL d'eau distillée (chauffer légèrement si nécessaire).Après refroidissement, sous agitation magnétique, à l'aide d'un pH mètre, ajuster le pH à 7.4 avec de l'NaOH (6N).Verser le mélange obtenu dans une fiole de 500mL et ajuster au volume final de 500mL avec de l'eau bi distillée. La durée de stockage de ce tampon est de 6 mois.

Les tampons phosphate (0.005M, pH 7.4) est préparé à partir d'une dilution de la solution mère de TP à 0.5M avec addition du conservateur Azide de Sodium NaN_3 à 0.1%, soit 0.1g/100mL (Mohan, 2003).

3. Protocole de dosage RIA de la progestérone

Les échantillons de sérums bovins sont dosés par RIA en utilisant une trousse Immunotech/sérum humain (Code 1188). Le protocole de dosage est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Mode opératoire du dosage RIA progestérone de la trousse Immunotech sérum humain (Appendix trousse immunotech, 2015)

Etape 1 Répartition	Etape 2 Incubation	Etape 3 Comptage
Dans les tubes recouverts d'anticorps, Distribuer successivement 50µl d'étalon ou d'échantillon (en double) et 500µl de traceur* Agiter	Incuber pendant 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 minute

* Ajouter 500µl de traceur dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux

4. Evaluation analytique de la trousse commerciale 'Immunotech' pour le dosage de la progestérone dans des échantillons sériques bovins

Les performances analytiques de la trousse Immunotech ont été évaluées en utilisant des échantillons de sérum bovin. L'évaluation analytique concerne les paramètres suivants :

a. Le test de précision

La précision d'un dosage exprime la reproductibilité des résultats de dosage de la progestérone par la technique RIA, de trois (03) échantillons sériques bovins de concentration en progestérone basse (0.55ng/mL), intermédiaire (11.84 ng/mL) et haute (19.93 ng/mL) en intra-dosage (n=10) et en inter-dosages (n=10). Pour chaque sérum dosé, sont calculés la moyenne des concentrations obtenues, l'écart-type et le coefficient de variation (%).

b. Le test d'exactitude

- **Test de dilution** : trois (03) échantillons sériques bovins de concentration en progestérone élevée (12.24, 16.61 et 8.07ng/mL) sont dilués chacun en cascade, dans l'étalon sérique bovin zéro progestérone, aux dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. Les concentrations en progestérone de chaque échantillon et de leurs dilutions sont déterminées en deux fois par dosage RIA. Les valeurs en progestérone mesurées sont comparées aux valeurs attendues et des pourcentages de recouvrements sont calculés selon la formule suivante (**Nicolas et al., 2004**)

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

- **Test de surcharge** : il est réalisé avec trois (03) échantillons sériques bovins de concentration en progestérone basse (0.49, 0.40 et 0.55ng/mL). Il consiste à ajouter à un volume de 200µl de chacun de ces échantillon un volume équivalent et séparément de trois autres échantillons sériques bovins de concentration en progestérone respectivement de 0.55, 11.85 et 19.93ng/mL.

Chaque échantillon préparé est dosé en deux fois par RIA. Les valeurs en progestérone mesurées sont comparées aux valeurs attendues et des pourcentages de recouvrements sont calculés selon la formule ci-dessus.

5. Préparation du sérum bovin déplété (SBD)

Les sérums de taureaux collectés au niveau de l'abattoir d'El Harrach sont traités par le charbon actif afin d'éliminer toute trace de stéroïdes notamment la progestérone.

Les sérums sont déplétés à l'aide de charbon actif, prélevés et séchés à raison de 5 g par 100 mL, durant 2 heures à 45°C.

Après une centrifugation à 3000 tr/min pendant 30 min, les surnageant obtenus sont filtrés successivement à travers des membranes de 1µm, 0,45µm et 0,22 µm afin d'éliminer toutes les fines particules de charbon. L'absence de toute trace de stéroïde est vérifiée par

radioimmunos dosage des extraits obtenus après traitement des sérums déplétés par de l'éther (Lupi-chen et al., 1999).

6. Préparation des étalons de progestérone

6.1. Préparation et calibration de la solution mère de progestérone

Nous avons préparé une solution mère (S1) de progestérone à une concentration de 0.2mg/mL par dissolution de 5mg de progestérone pur dans 25mL d'éthanol.

Des solutions filles au nombre de 4 à une concentration de 4µg/mL sont préparées à partir de la solution mère en prenant 200µl de la solution S1 que l'on ajuste à 10mL avec du tampon phosphate (TP : 0.005M, pH7.4).

Afin d'atténuer le risque d'erreur aléatoire, les solutions mère à 4µg/mL préalablement préparées sont mélangées et homogénéisées en utilisant un agitateur magnétique de type IKA®RH digital KT/C, la solution obtenue est calibrée avec un spectrophotomètre UV de type T90+UV/VIS spectromètre PG instruments Ltd relié à un PC doté d'un logiciel (UV WIN5 LAB).

La densité optique (DO) de la solution mère est mesurée à 248nm (W) et la concentration en progestérone est déterminée à partir de la loi de Beer-Lambert.(Samuel et al., 2006).

$$A_{\lambda} = \log\left(\frac{I_t}{I_o}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l$$

ξ : coefficient d'extinction molaire (mol/cm), égale à 18000 pour la progestérone

C : concentration (nMol/l)

l : longueur de la cuve (1cm)

6.2. Préparation des étalons de progestérone dans un tampon phosphate

Une solution intermédiaire de concentration 1000ng/mL est préparée à partir de la solution à 4 µg/mL dans du tampon phosphate à 0.005 M et pH7.4.

Une deuxième solution intermédiaire de concentration 400ng/mL est préparée à partir de la solution à 1000 ng/mL dans du tampon phosphate à 0.005 M et pH 7.4 .

Les solutions standards de progestérone de concentrations croissantes (0-0.625-1.25-2.50-5-10-20 et 40ng/mL) sont préparées par dilution en cascade dans du tampon phosphate à 0.05 M et pH7.4 en commençant par le standard 40ng/mL (tableau 8).

Les étalons sont aliquotés dans des flacons pénicilline, en un volume de 1mL, puis lyophilisés et stockés à 4°C .

Selon le besoin de l'étude, ces étalons sont reconstitués chacun dans une matrice tampon phosphate ou sérum bovin (50% ou 100% v/v) .

Tableau.8 : Préparation des étalons progestérone par dilution dans une matrice tampon Phosphate .

Concentration de l'étalon préparé (ng/mL)	40	10	5	2.5	1.25	0.625
Concentration en progestérone de la solution prélevée (ng/mL)	400	40	10	5	2.5	1.25
Volume prélevé (mL)	5	12.5	25	25	25	25
Volume total préparé (mL)	50	50	50	50	50	50

7. Calibration des étalons par une trousse RIA progestérone commerciale

Les étalons de progestérone préparés dans du tampon phosphate sont calibrés par un dosage RIA progestérone, utilisant une trousse Immunotech sérique (code 1188). Chaque étalon est dosé 20 fois en intra essai, une valeur moyenne de la concentration est calculée avec un écart type et un coefficient de variation.

Le protocole de dosage est conforme à celui présenté précédemment au **tableau 7**.

8. Evaluation clinique de la trousse commerciale 'Immunotech' pour le dosage de la progestérone d'échantillons de sérums de vaches

Le dosage de la progestérone d'un lot de 136 échantillons de sérums de vaches à différents stades physiologiques, est réalisé par un dosage radioimmunologique utilisant une trousse RIA/Immunotech sérique, selon le protocole arrêté par le **tableau 7**.

La lecture des concentrations relatives aux tubes des inconnues (échantillons de sérums bovins), a été réalisée une première fois, sur la courbe d'étalonnage établie grâce aux étalons sériques humains fournis par la trousse Immunotech et les autres fois, en substituant la gamme étalons Immunotech, par les étalons progestérone préparés localement.

- **Cas des standards reconstitués dans un tampon phosphate (TP) supplémentés de sérum bovin déplété**

Pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, nous avons ajouté dans les tubes revêtus d'anticorps anti-progestérone : 50 µL de standard reconstitué dans du TP + 50 µL de sérum bovin déplété (zéro progestérone) + 500 µL de traceur.

Les concentrations obtenues sont corrigés par un facteur multiplicatif de 1,1 (facteur de dilution des standards par rapport aux échantillons) (**Lupi-chen et al., 1999**).

- **Cas des standards reconstitués dans le sérum bovin déplété (SBD)**

Pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, nous avons ajouté dans les tubes revêtus d'anticorps anti-progestérone : 50 μ L de standard reconstitué dans du SBD (à 50% et à 90% V/V) + 500 μ L de traceur.

9. Analyse statistiques des données expérimentales

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, l'évaluation des coefficients de corrélation, l'analyse de la variance et le test T pour la comparaison des moyennes. Les logiciels utilisés sont l'Excel Microsoft et ANOVA à un facteur de variation (**ANOVA a 1 facteur online**).

Chapitre 3 :
Résultats et discussion

Suite à l'avènement de la pandémie de **COVID-19** et la conséquence de confinement, qui a mis fin à l'exécution de la partie pratique du protocole de travail de mon mémoire, les résultats expérimentaux qui ont fait l'objet de cette valorisation, rentrent dans le cadre d'une étude préliminaire antérieure, réalisée en Octobre 2016 par ma promotrice, non encore exploités. L'étude a été réalisée sur un lot de 136 échantillons de sérum bovins collectés sur des vaches, à différents stades physiologiques fournis dans le cadre de projets de coopération CRND/structures de l'élevage.

1. Evaluation analytique de la trousse commerciale ‘Immunotech ’pour le dosage de la progestérone dans des échantillons sériques bovins

1.1 Le test de précision

Le test de précision de la trousse "Immunotech IM1188", évalué à travers les variations intra et intéressais de trois concentrations de progestérone sériques bovines (**tableaux 9a et 10a**) montre des performances largement inférieures à celles rapportées par le fournisseur (Appendix trousse immunotech, 2015) (**tableaux 9b et 10b**), qui sont obtenues lors de la validation de cette trousse avec des sérums humains.

En effet, alors que les coefficients de variation enregistrés par le fournisseur, lors des intra et intéressais sont pour leurs majorités inférieures au seuil admis de 10% (5.02% - 8.66%), ceux obtenus lors de nos essais avec des sérums bovins, sont légèrement supérieurs à ce seuil. Ils sont respectivement de 11.7% et 10.7% pour les moyennes concentrations et de 12.5% et 3% pour les fortes concentrations. Pour les basses concentrations, cette variation passe à 19% en intraessais, ce qui indique une zone de mauvaise précision.

Tableau. 9a : Résultats de reproductibilité intraessais de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins

Sérum	S1	S2	S3
Nombre de répétition	10	10	10
Valeur moyenne (ng/mL)	0,55	11,85	19,93
C.V. (%)	19.32	11.71	12.55

Tableau. 9b : Résultats de reproductibilité intraessais de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums humains (Appendix trousse immunotech, 2015)

Sérum	S1	S2	S3
Nombre de répétition	25	25	25
Valeur moyenne (ng/mL)	0.46	3.41	36.92
C.V. (%)	8.15	5.84	5.02

Tableau. 10a : Résultats de reproductibilité intéressais de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins

Sérum	S1	S2	S3
Nombre de répétition	10	10	10
Valeur moyenne (ng/mL)	0.48	10.64	19.88
C.V. (%)	12.84	10.69	2.98

Tableau. 10b : Résultats de reproductibilité intéressais de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums humains (Appendix trousse immunotech, 2015)

Sérum	S1	S2	S3
Nombre de répétition	10	10	10
Valeur moyenne (ng/mL)	0.28	7.97	26.21
C.V. (%)	8.66	5.26	7.25

1.2. Le test d'exactitude

➤ Tests de dilution

Les résultats relatifs à l'épreuve de dilution tels qu'ils sont montrés par le **tableau 11a**, enregistrent des taux de recouvrement en dessous de la fourchette de 80-120%, pour les 2/3 des concentrations de sérums bovins analysées (S1 et S2).

Ces valeurs sont en deçà de la performance analytique reportée par le fournisseur lors des tests de validation de la trousse avec des sérums humains (**tableau 11b**). Les taux enregistrés par les sérums S1 et S2, varient de 42% à 84%.

Tableau. 11a : Résultats de l'épreuve de dilution de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins.

Sérum	Dilution	Progestérone (ng/mL)		Taux de recouvrement (%)
		Mesurée	Attendue	
S1	1	16.61	-	-
	1:2	7.02	8.31	84.47
	1:4	3.04	4.15	73.25
	1:8	1.26	2.07	60.86
	1/16	0.59	1.04	56.73
	1/32	0.32	0.52	61.54
S2	1	12.24	-	-
	1:2	4.73	6.12	77.29
	1:4	2.11	3.06	68.95
	1:8	0.98	1.53	64.05
	1/16	0.42	0.77	54.54
	1/32	0.16	0.38	42.10
S3	1	8.07	-	-
	1:2	3.33	4.04	82.42
	1:4	1.29	2.02	63.86
	1:8	0.97	1.01	96.03
	1/16	0.48	0.5	96.0
	1/32	0.22	0.25	88.0

Tableau. 11b : Résultats de l'épreuve de dilution de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums humains (Appendix trousse immunotech, 2015).

Sérum	Dilution	Progestérone (ng/mL)		Taux de recouvrement (%)
		Mesurée	Attendue	
S1	1	29.26	-	-
	1:2	17.42	14.53	120
	1:4	8.28	7.27	114
	1:8	3.20	3.63	88.1
	1/16	1.57	1.82	86.4
	1/32	0.85	0.91	93.6
S2	1	26.34	-	-
	1:2	13.40	13.2	101.8
	1:4	6.69	6.59	101.6
	1:8	2.73	3.29	82.92
	1/16	1.46	1.65	88.69
	1/32	0.80	0.82	97.19
S3	1	15.63	-	-
	1:2	7.22	7.82	92.39
	1:4	3.19	3.91	81.64
	1:8	1.68	1.95	85.99
	1/16	0.83	0.98	84.96
	1/32	0.40	0.49	81.89

Par ailleurs, ces mêmes résultats obtenus lors du test de dilution illustrés par les **figures 12a et 12b**, montrent pour les dosages réalisés sur des sérums humains, une bonne linéarité des courbes de dilutions ($r^2 = 1$), de pente équivalant presque à la concentration du sérum initiale et dont l'ordonnée à l'origine est légèrement différente de zéro.

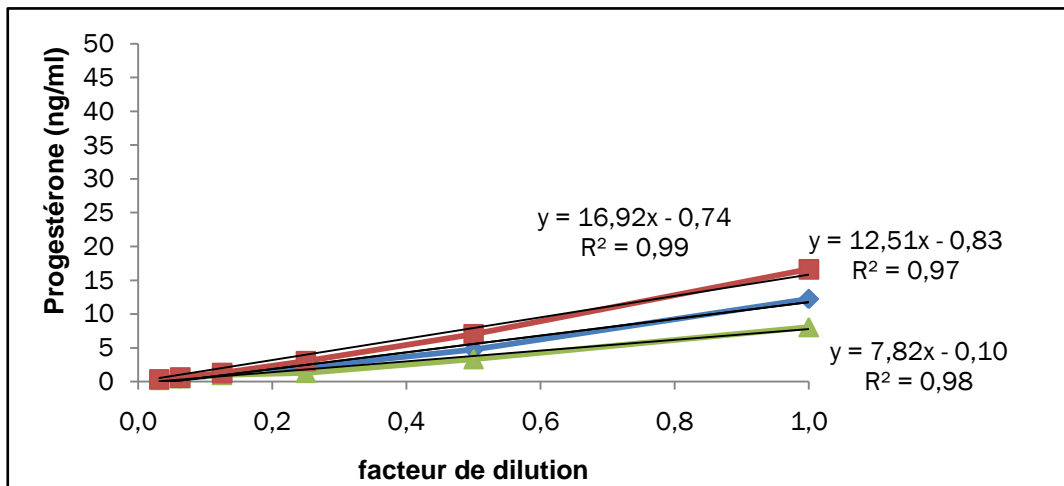


Figure.12a: Représentation graphique de l'épreuve de dilution avec des sérums bovins

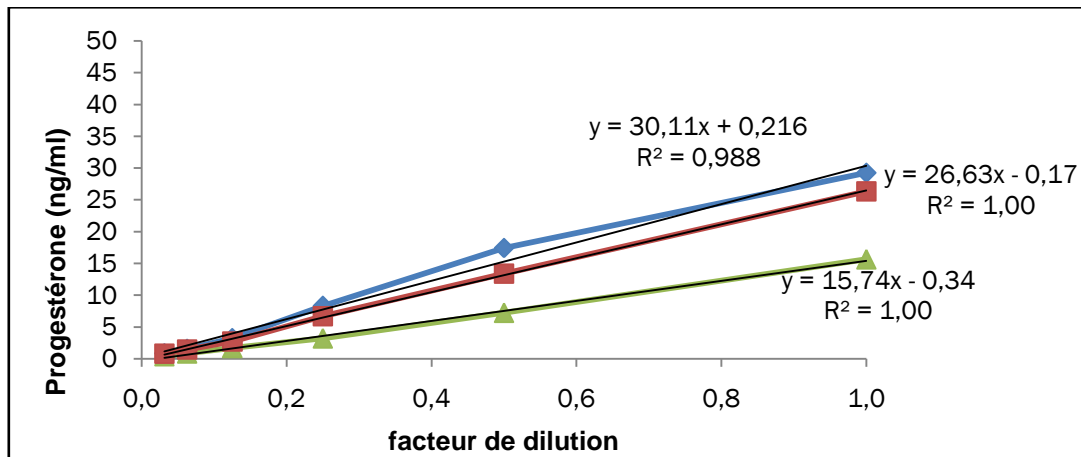


Figure. 12b : Représentation graphique de l'épreuve de dilution avec des sérums humains

➤ **Tests de surcharge**

Les résultats des épreuves de surcharge consignés dans le **tableau 12a**, montrent des taux de recouvrement pour l'ensemble des sérums bovins surchargés dans les normes (compris dans la fourchette de 80-120%) et ils sont comparables à ceux rapportés par le fournisseur (**tableau 12b**), à l'exception des sérums surchargés avec un sérum bovin de faible concentration (0.55ng/ml).

Tableau. 12a : Résultats de l'épreuve de surcharge de la trousseRIA/progestérone Immunotech avec des sérums bovins

Sérum	Concentration (ng/mL)				Taux de recouvrement (%)
	sérum	ajoutée	mesurée	attendue	
S1	0.49	0.55	0.85	0.52	163.46
		11.85	6.33	6.17	102.59
		19.93	8.39	10.21	82.17
S2	0.40	0.55	0.76	0.475	160
		11.85	5.67	6.125	92.57
		19.93	8.38	10.165	82.44
S3	0.55	0.55	0.92	0.55	167.27
		11.85	6.54	6.2	105.48
		19.93	8.52	10.24	83.20

Tableau. 12b : Résultats de l'épreuve de surcharge de la trousse RIA/progestérone Immunotech avec des sérums humains (Appendix trousse immunotech, 2015).

Sérum	Concentration (ng/mL)				Taux de recouvrement (%)
	sérum	ajoutée	Mesurée	attendue	
S1	0.024	33.31	35.34	33.34	106
		4.46	3.81	4.48	85
		0.90	0.71	0.93	76
S2	0.160	33.31	33.80	33.47	101
		4.46	4.39	4.62	95
		0.90	1.00	1.06	94
S3	0.068	33.31	38.05	33.38	114
		4.46	4.21	4.53	93
		0.90	1.03	0.97	106
S4	0.200	33.31	36.85	33.50	110
		4.46	3.99	4.64	86
		0.90	1.02	1.09	94

La trousse radioimmunologique commerciale 'Immunotech' est pourvue d'étalons à base de sérum humain. Son utilisation pour le dosage direct et sans modification de la progestérone dans un sérum animal, aboutit à des résultats biaisés à cause de l'impact des différences existant entre les sérums de diverses espèces animales, notamment celles liées d'une part à la nature et la concentration des protéines de liaison et d'autre part aux taux d'acides gras libres contenus dans les sérums (**Lupi-chen et al., 1999**).

En effet, les résultats obtenus lors de notre étude préliminaire, relatifs aux caractéristiques analytiques d'un tel dosage confirment l'importance de l'uniformité de la matrice des étalons et celle des échantillons à doser, sur le déroulement de la réaction immunologique. Cette différence influe sur la qualité de la précision et l'exactitude du test, en particulier pour des faibles concentrations.

2. Calibration des étalons de progestérone préparés dans différentes matrices

La calibration des étalons de progestérone préparés dans une matrice 100% tampon phosphate (TP), a été réalisée par un dosage radioimmunologique, utilisant la trousse RIA commerciale 'Immunotech' de dosage de la progestérone dans le sérum humain.

Les résultats obtenus (**Tableau 13**) et qui sont illustrés par la **figure 13**, montrent une superposition des valeurs pour chaque étalon, traduisant une forte corrélation ($r^2 = 0,99$) entre les concentrations en progestérone mesurées dans les étalons tampon phosphate (TP) et celles attendues ou calculées.

Cette relation est une droite de type linéaire qui passe par l'origine, d'équation $y=1,04x$. Par ailleurs, ces résultats confirment le choix du tampon phosphate comme matrice neutre pour la constitution de la gamme d'étalons, en raison de l'absence de toute interférence avec la matrice constituant la gamme standard de la trousse ayant servi pour la calibration et représentent donc les concentrations en progestérone réelles des étalons préparés.

Tableau.13 : Concentrations en progestérone des étalons préparés au laboratoire, reconstitués dans trois différentes matrices

Etalons	Valeurs calculées (ng/mL)	valeurs mesurées (ng/mL)			Rapports des concentrations	
		TP	Sérum 50%	Sérum 90%	Sérum50%/T P	Sérum90%/T P
0	0	0	0,29	1,55	-	-
1	0,625	0,49	1,01	3,34	2,06	6,82
2	1,25	1,11	1,65	4,09	1,45	3,68
3	2,5	3	3,16	6,95	1,05	2,32
4	5	5,48	7,19	14,6	1,31	2,66
5	10	12,67	14,46	25,55	1,14	2,02
6	40	41,23	50,85	77,84	1,23	1,89

Quant aux étalons reconstitués dans la matrice sérum bovin déplété, les concentrations en progestérone mesurées à l'aide de la trousse RIA/progestérone 'Immunotech', dont les standards sont à base de sérum humain, enregistrent une hausse à mesure que le taux d'incorporation du sérum bovin (SBD) dans la matrice passe à 50% puis à 90% (**tableau13, figure14**).

Aussi, pour chacune des matrices sériques bovines, on enregistre une diminution du rapport des concentrations en progestérone mesurées pour chaque étalon sur la concentration mesurée dans l'étalon correspondant de la matrice tampon, à mesure que la concentration en progestérone de l'étalon augmente et une hausse de ce rapport avec la hausse du taux d'incorporation de la matrice sérique bovine dans l'étalon.

Ces résultats font clairement apparaître l'effet de l'introduction de la matrice sérique bovine dans les étalons sur la hausse des concentrations en progestérone de ces étalons, autrement dit l'impact de la différence entre la matrice de la gamme standard de la trousse de dosage et la matrice des échantillons à analyser.

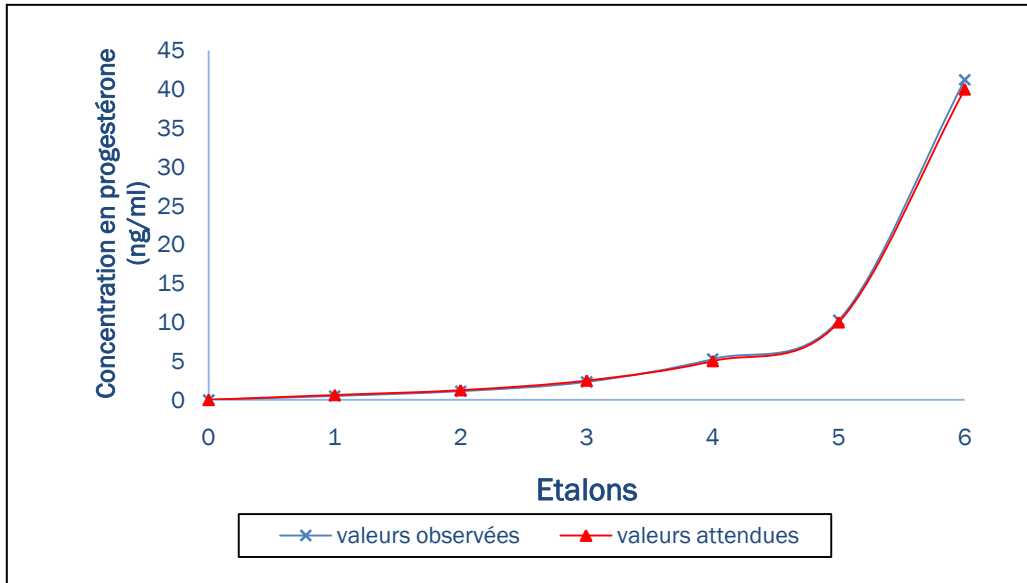


Figure. 13: corrélation entre les concentrations en progestérone mesurées dans les étalons tampon phosphate et les valeurs calculées.

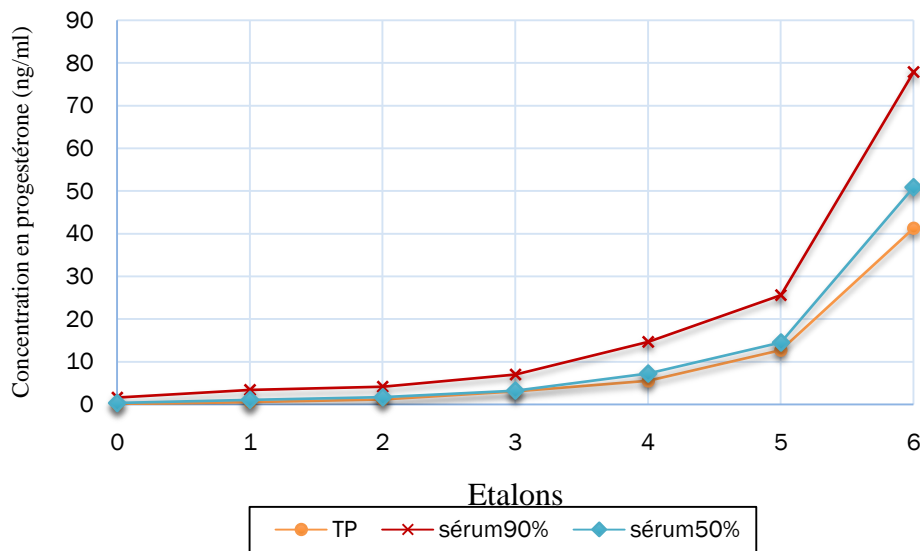


Figure. 14: Evolution des concentrations en progestérone des étalons préparés reconstitués dans trois différentes matrices.

3. Evaluation clinique de la trousse commerciale ‘Immunotech ‘pour le dosage de la progestérone d’échantillons sériques bovins et comparaison aux résultats des gammes étalons sérum bovin préparées

- **Evaluation des courbes d’étalonnage progestérone des différentes matrices**

Afin de mieux cerner l’impact de l’hétérogénéité des milieux réactionnels entre la gamme standard et les échantillons lors d’un dosage immunologique, nous avons réalisé le dosage de la progestérone d’un lot de 136 échantillons sériques de vaches laitières, à différents stades physiologiques.

Le dosage a été réalisé par l’utilisation d’une trousse commerciale RIA progestérone ‘Immunotech’, validée pour le dosage de ce stéroïde dans le sérum humain. Pour s’affranchir de la différence existant entre les sérums de la gamme standard et les échantillons lors du dosage, les tubes revêtus d’anticorps et le traceur de la trousse ont été maintenus, la gamme standard de la trousse est remplacée par trois autres gammes standards contenant le sérum bovin. La première gamme d’étalons est à base de tampon supplémentée par 50µl de SBD (**Lupi-chen et al., 1999**) et deux autres gammes d’étalons constituées respectivement de 50% et 90% de SBD.

Les résultats des taux de liaisons par rapport à la liaison maximum (%B/Bo) obtenus pour chaque gamme d’étalons sont représentés dans le **tableau14** et les courbes d’étalonnage sont illustrées par la **figure15**.

Tableau.14 : Pourcentages de liaisons (B/Bo) correspondant à chaque étalon des gammes standards

Matrices des gammes standards					
Immunotech		progestérone des étalons (ng/mL)	TP+50µl SBD	SBD à 50%	SBD à 90%
progestérone des étalons (ng/mL)	%B/Bo		%B/Bo	%B/Bo	%B/Bo
0	100	0	100	100	100
0,09	85,16				
0,45	69,05	0,49	73,52	57,09	66,18
2	37,67	1,11	57,77	48,54	56,09
		3	45,03	36,66	40,64
		5,48	34,35	26,14	30,74
13	15,8	12,67	23,29	18,13	23,02
56	6,05	41,23	10,54	7,53	9,7

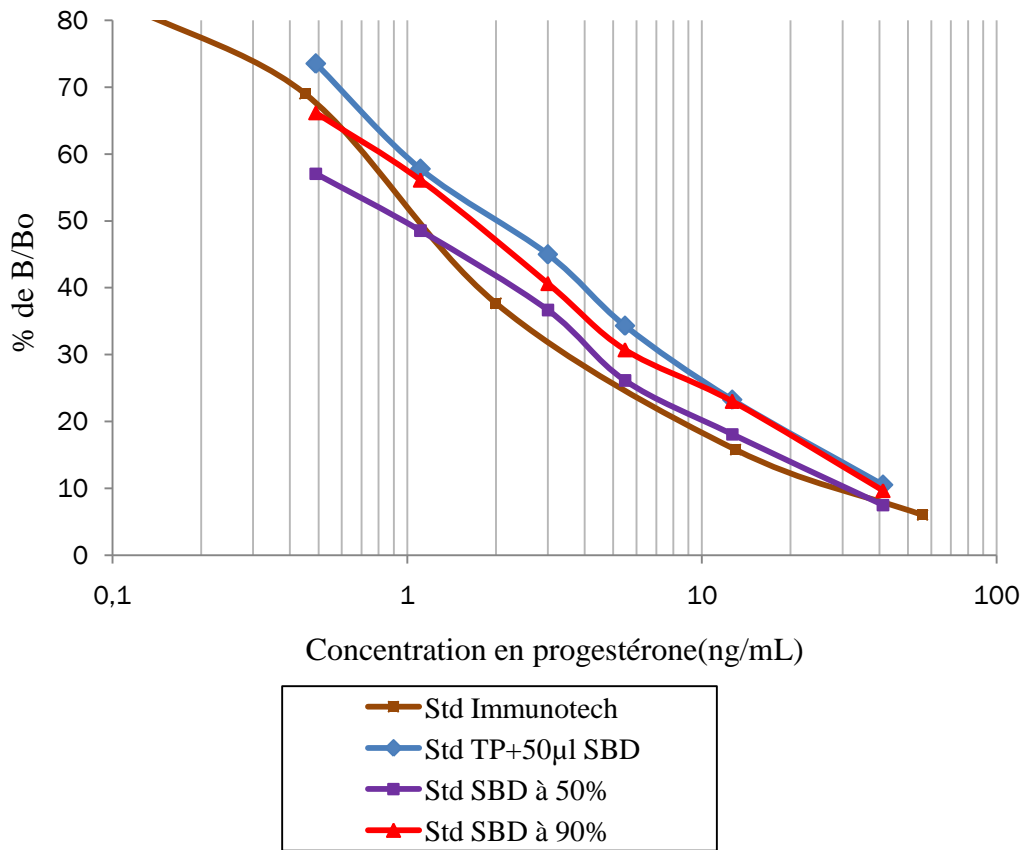


Figure 15 : Courbes standards de dosage de la progestérone

Tableau15 : Paramètres de contrôle de qualité des gammes standards.

Paramètres	Matrices des gammes standards			
	Immunotech	TP+50µl SBD	SBD à50%	SBD à 90%
TC(CPM)	35641,9	35434,9	35548,2	35112,9
Bmax(%)	55,2	35,8	47,1	38,4
Estimation des doses de progestérone (ng/ml) à :				
20% B/B0	8,17	15,94	9,99	14,2
50% B/B0	1,09	2,04	1,02	1,59
80% B/B0	0,18	0,3	0,14	0,22
Détection limite (ng/ml)	0,05	0,11	0,03	0,08

Les courbes standards obtenues montrent des allures identiques, avec un léger rapprochement des courbes Immunotech et 50%SBD et des courbes TP supplémenté de SBD et SBD à 90%. Cette similitude est aussi observée au niveau des paramètres de contrôle de qualité propre à chaque gamme d'étalons (**tableau 15**).

Les liaisons maximales (B0/T) et les limites de détections varient en fonction des matrices dans lesquelles sont préparés les standards de progestérone. Elles sont respectivement de 55.2% et 0.05ng/ml pour la gamme Immunotech, 47.1% et 0.03ng/ml pour la gamme SBD incorporé à 50%, 35.8% et 0.11ng/ml pour la gamme TP surchargé de 50µl de SBD et 38.4% et 0.08ng/ml pour la gamme SBD incorporé à 90%.

- **Evaluation des résultats de concentrations de progestérone des sérums bovins**

Quant aux résultats de dosages radioimmunologique direct de la progestérone du lot de 136 échantillons de sérum de vaches laitières, ils sont rapportés au niveau de l'annexe. Les concentrations en progestérone ont été mesurées avec les quatre gammes standards et ont été classées selon des intervalles de concentrations basses (0-1ng/mL), moyennes (1-6ng/mL) et élevées (6-21ng/mL). Ces intervalles de concentrations ont été représentés respectivement par **les figures 16a, 16b et 16c**.

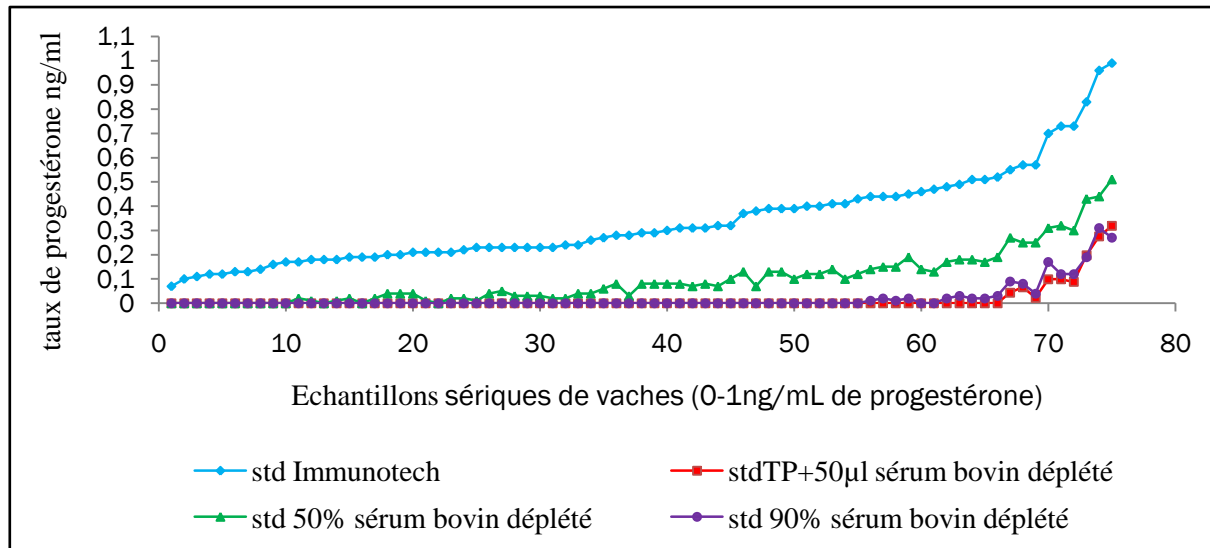


Figure. 16a : Taux progestéronémiques des sérums bovins (intervalle de concentrations : 0-1ng/ml)

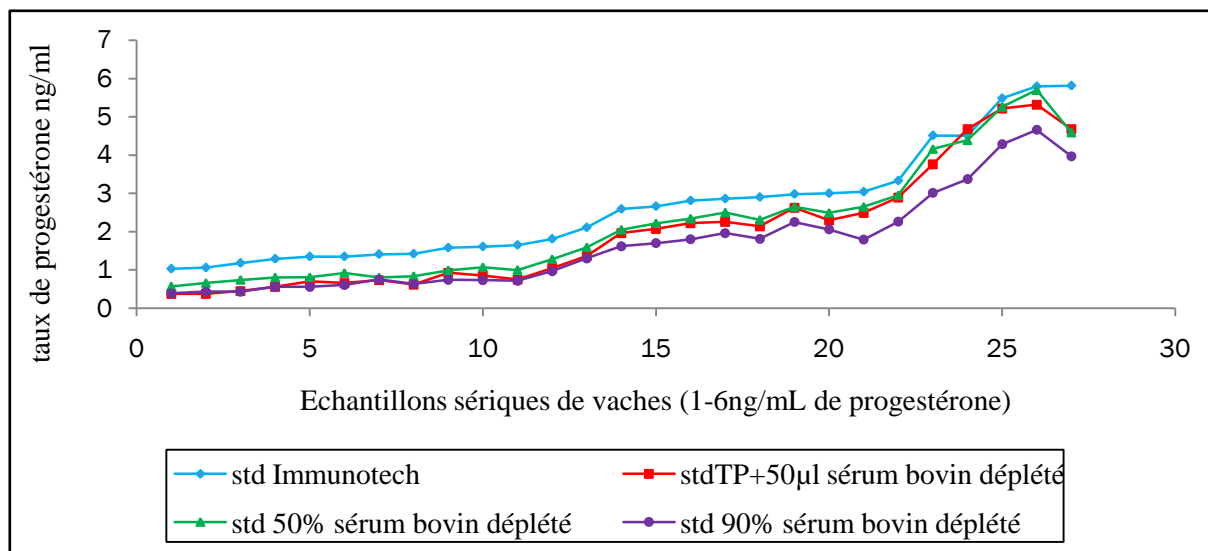


Figure. 16b : Taux progestéronémiques des sérums bovins (intervalle de concentrations : 1-6ng/ml)

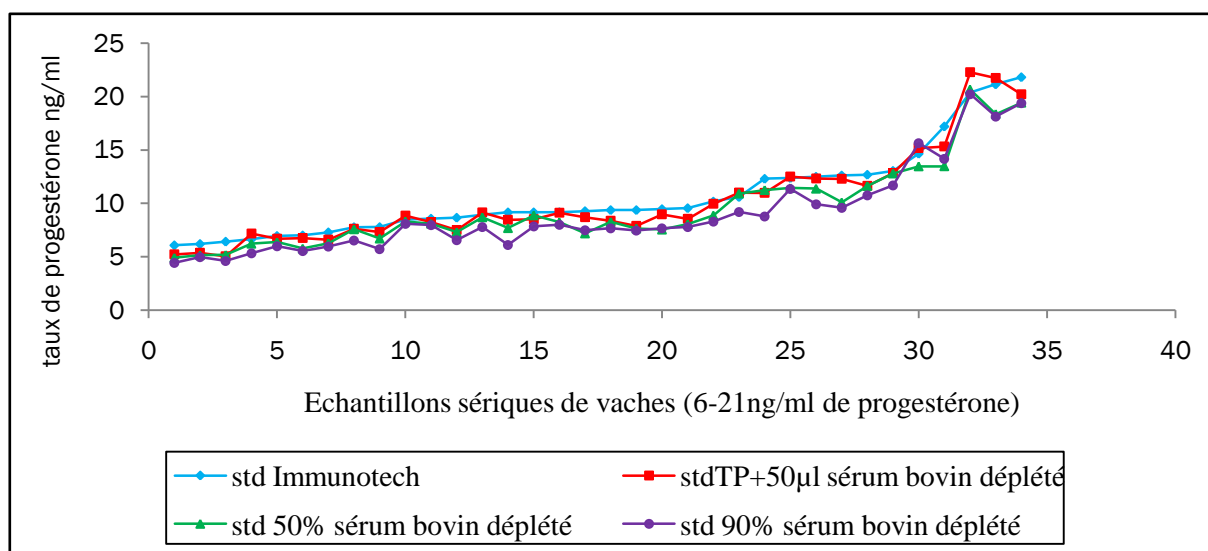


Figure. 16c : Taux progestéronémiques des sérums bovins (intervalle de concentrations : 6-21ng/ml)

L'analyse statistique des concentrations en progestérone obtenue pour l'ensemble des échantillons (0-21ng/mL), ne montre pas de différence significative entre les quatre gammes standards ($p=0.57$).

Les moyennes de concentrations en progestérone obtenues sont de 3.37ng/mL, 2.96ng/mL, 2.86ng/mL et 2.59ng/mL respectivement pour les gammes Immunotech, TP supplémenté, 50% SBD et 90% SBD.

Cependant, ces mêmes résultats analysés par intervalle de concentrations, l'intervalle 0-1ng/mL affiche, contrairement aux intervalles 1-6ng/mL et 6-21ng/mL, une différence très hautement significative entre les concentrations lues par les différentes gammes standards ($p < 0.00001$).

Dans la zone des basses concentrations, la comparaison des moyennes a montré une différence très hautement significative entre les concentrations lues sur la gamme standard Immunotech et les gammes standards SBD ($p < 0.00001$) et entre les concentrations lues sur la gamme standard 50%SBD et les gammes standards TP supplémenté et 90% SBD ($p < 0.001$). Ces dernières sont statistiquement identiques ($p = 0.99$).

En effet, les moyennes des concentrations en progestérone enregistrées pour cet intervalle sont de l'ordre de 0.34ng/mL, 0.02ng/mL, 0.10ng/mL et 0.02ng/mL respectivement pour les gammes Immunotech, TP supplémenté, 50% SBD et 90% SBD. Cette surestimation des concentrations peut être la conséquence d'un traceur qui se lie fortement à la matrice de l'échantillon, alors qu'il ne l'est pas autant à la matrice des standards, lorsque les matrices des standards et des échantillons sont différentes (**Lupi-chen et al., 1999**).

Conclusion

Conclusion

Cette étude consiste à identifier l'existence d'une interférence et déterminer son impact, lors de l'usage de trousses radioimmunologiques commerciales validées pour doser la progestérone dans le sérum humain, pour le dosage direct de la progestérone dans des échantillons sériques de vaches.

Les résultats obtenus lors de la validation analytique de la trousse commerciale, réalisée avec des sérums bovins, montrent une baisse de la performance analytique comparée à celle rapportée par le fournisseur surtout pour les échantillons de faible concentration. Le test de précision a enregistré des coefficients de variations en inter et intra-assais, dans l'ensemble au-delà de la norme de 10%. Quant à l'évaluation de l'exactitude du dosage, elle a révélé pour le test de dilution, des taux de recouvrement de moins de 80%, pour les 2/3 des sérums bovins analysés et pour les épreuves de surcharge, des taux de recouvrement pour l'ensemble des sérums bovins surchargés, comparables à ceux rapportés par le fournisseur (compris dans la fourchette de 80-120%), à l'exception des sérums surchargés avec un sérum bovin de faible concentration (0.55ng/mL).

Pour s'affranchir de cette interférence, sur la base des travaux menés par **Lupi-Chen et al(1999)**, nous avons préparé dans une matrice tampon phosphate (TP) et calibré des étalons de progestérone. Les résultats obtenus ont montré une forte corrélation ($r^2 = 0,99$) entre les concentrations en progestérone mesurées dans les étalons tampon phosphate (TP) et celles attendues. Les concentrations en progestérone des étalons reconstitués dans la matrice sérum bovin déplété enregistrent une hausse à mesure que le taux d'incorporation du sérum bovin (SBD) dans la matrice passe à 50% puis à 90% ou la supplémentation de l'étalon TP par 50 μ L de SBD.

Pour la validation clinique, les résultats dosage direct de la progestérone dans 136 échantillons de sérums bovins, avec une trousse RIA/progestérone commerciale 'Immunotech' en intégrale d'une part et en substituant la gamme étalons fournie par celles préparées localement d'autre part, montrent pour l'intervalle 'concentration en progestérone 0-1ng/mL', contrairement aux intervalles 1-6ng/mL et 6-21ng/mL, une différence très hautement significative entre les valeurs lues par les différentes gammes standards ($p < 0.00001$). Ces résultats indiquent une surestimation des basses concentrations par la gamme d'étalons 'Immunotech' comparées aux concentrations données par les gammes SBD. Cette surestimation est atténuée à mesure que la concentration en progestérone augmente dans l'échantillon.

La finalité de cette étude nous apprend dans un premier temps, que pour le dosage de sérums bovins, l'usage intégral de la trousse commerciale destinée pour les tests humains affecte sensiblement les performances analytiques et cliniques de la trousse, surtout la zone des faibles concentrations. Aussi, pour s'affranchir de ces limites, il est possible de préparer et de calibrer une gamme d'étalons progestérone, dans une matrice tampon phosphate. A des fins de dosage, ces étalons doivent être supplémentés de 50µL de SBD ou reconstitués dans 90% SBD, en remplacement aux étalons fournis dans la trousse.

Il faut rappeler que ces résultats sont issus d'une étude préliminaire, pour cette raison, il serait judicieux de les confirmer par une étude ultérieure qui portera sur un lot d'échantillons de sérums bovins plus important et à des stades physiologiques bien définis.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Appendix** des caractéristiques du dosage de la trousse RIA pour le dosage in vitro de la progestérone dans le sérum ou le plasma humain (IM1188), Beckman Coulter 2015.
- **Anova a 1 facteur** STHDA.Statistical Tools For High-Throughput Data Analysis .<http://www.sthda.com/french/>.
- **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., 1992.** "Les immunodosages : de la théorie à la pratique", LYON.
- **Banu, T.A., Shamsuddin, M., Bhattacharjee, J., Islam, M.F., Khan, S. et Ahmed, J.U., 2012.** "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*, 54:30 .
- **Barbier, Y., 1989 a** " Principes généraux des immunodosages. Les immunodosages de la théorie à la pratique", Chapitre 4, Ed ACOMEN, 249p, ISBN : 2-907794-00-0.
- **Barbier, Y., 1989 b** " Réactions antigènes-anticorps. Les immunodosages de la théorie à la pratique", Chapitre 3, Ed ACOMEN, 249p, ISBN : 2-907794-00-0.
- **Barbier, Y., 1989 c** " Les antigènes. Les immunodosages de la théorie à la pratique", Chapitre 3, Ed ACOMEN, 249p, ISBN : 2-907794-00-0.
- **Barbry, JB., 2012.** Diagnostic de gestation chez la vache : dosage des protéines associées à la gestation dans le sang et le lait par méthode ELISA.
- **Bayard, F., 1981.** "Régulation physiologique et pharmacologique des récepteurs stéroïdiens sexuels dans l'endomètre", 4-5, Vol 42, 321-6.
- **Beaudonnet et Cohen , 1995.** «Pièges et problèmes en immunodosages» Cahier de formation Biologie médicale N 02, Mai 1995, Immunodosages : hormones, marqueurs tumoraux. Bioforma.
- **Benoist, J.F., Biou, D., et Chevenne, D., 2011.** «Chapitre 2 : Dosage des marqueurs biologiques par immunoanalyse. In Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives", 2^{ème} édition revue et augmentée par Jean-Louis Beaudeau et Geneviève Durand. Ed : lavoisier ,9-38. ISBN : 2257204727.
- **Bensegueni, A., 2006.** Biochimie : cours et exercices d'application.Édition de l'université de Constantine, pp 23.

- **Béné, M.C., Drouet, C., Fisson, S. et Seillès, E.,(2014)** "Méthodes en immunologie : Des principes aux bonnes applications", 2014, Ed Elsevier Masson SAS. ISBN : 978-2-294-74022-0, 213pp.
- **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., 2015.** "Effect of progesterone supplementation on fertility responses of lactating dairy cows with corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol", *Theriogenology* 83 ,257–265
- **Borel, J.P., Randoux, A., Maquart, F.X., Gillery, P., Le Peuch, Ch., Bellon, G. et Monboisse, J.C., 1997.** "Biochimie dynamique", De Boeck & Larciens. A., Paris, Bruxelles, ISBN 2-8041-2453-3).
- **Bornet, H et Charrie, A., (1989)** " Conditions expérimentales d'un immunodosage : Les immunodosages de la théorie à la pratique", Chapitre 3, Ed ACOMEN, 1989, 249p, ISBN : 2-907794-00-0.
- **Bourrel, F. et Courrière, P., 2003.** "Radioanalyse - Définitions et techniques", Techniques de l'ingénieur. L'expertise technique et scientifique de référence (2003), p3360.
- **Bouzebda, Z., Bouzebda-Afri, F.,Guelatti, M. A., Meharzi, M. N., 2008.** " Enquête sur la gestion de la reproduction dans des élevages laitiers bovins de l'Est Algérien." Sciences &Technologie C – N°27, pp.29-36.
- **Bryyner R.W.,Garcia_Winderm., Lewis P.E., Inskeep E.K. et Butcher R.L., 1990.** Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 7(2):181-190.
- **Burhol, P,G., 1984.** «On Plasma/Serum Interferences on Radioimmunoassay of Regulatory Peptides» *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 19:2, 129-130, DOI:10.1080/00365521.12005697.
- **Carrière P. D., Picard-Hagen N., Véronique G., 2012.** Physiologie du système reproducteur de la vache laitière.
- **Chiu, M,L, Walson L., Steven T. Snyder, Pak Kin Wong, Joseph C. Liao and Vincent G., 2010.** «Matrix Effects A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis» DOI:10.1016/j.jala.2010.02.001 .15: 233 *Journal of Laboratory Automation*.
- **Christensen, A.C.M., Haresign, W., Khalid, M., 2014.** «Progesterone exposure of seasonally anoestrous ewes alters the expression of angiogenic growth factors in preovulatory follicles", *Theriogenology* 81 ,358–367.
- **Cohen, R., 2006.** « Immunodosages avec marqueurs ». EMC – Biologie Médicale 1(1):1-12 DOI: 10.1016/S2211-9698(06)76401-9.

- **Colazo, M.G., Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Small, J.A., 2008.** "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, 32–36.
- **DesCôteaux, L., Vaillancourt, D., 2012.** Vade-mecum de gestion de la reproduction des bovins laitiers. Ed Med'com, 240p.
- **Derivaux, J., Ectors, F., 1980.** Physiopathologie de la gestation et obstétrique vétérinaire Maisons-Alfort : Éditions du « point vétérinaire».
- **Drion, P.V., Beckers, J-F., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J-Y., Lonergan, P., 1996.** "Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogénèse et atresie", *Le Point Veterinaire*, vol. 28, numéro spécial "Reproduction des ruminants"
- **Dubois, M., 2008.** Développement de techniques analytiques pour l'évaluation des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 268pp.
- **Edqvist, L.E., 1993.** "The hormones of reproduction", In: KING G.J., world animal science vol. B9: reproduction in domesticated animals, Amsterdam: ELSEVIER, 1993, 55-74.
- **Ekins, R. P., 1993.** New perspectives in radioimmunoassay. *Nuclear Medicine Communications*. 14(9):721-735.
- **FAO/AIEA, 1997.** joint programme Animal production and health "Self coating milk progesterone RIA Kit" Bench protocol January 1997.
- **Gabeur, B., 1989.** "La progestérone et les progestagènes chez la jument : utilisation des dispositifs intravaginaux", Thèse Méd. Vét., Alfort, n°113, 1989, 91p.
- **Gace, M., Prskalo, Z., Dobrijevic, S., and Mayer, L., 2015.** «Most common interferences in immunoassays». *LibriOncol.*, Vol. 43, No 1-3, 23 – 27.
- **Gayrard, V., 2007.** Physiologie de la reproduction des mammifères. Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, 198p
- **Goldsby, R.A., Kindi, T., Osborne, B.A., 2000.** Kuby Immunology. fourth edition. January 1, 1973.
- **Grimard B., et Disenhaus C., 2005.** Anomalie de reprise de la cyclicité chez la vache laitière.
- **Gröschl M., 2009.** "Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire", *Ann Biol Clin*, vol. 67, n o 5, septembre-octobre, 493-504.
- **Guéris, J., et Ferrière, C., 1989.** "A propos des molécules utilisées pour la confection des courbes d'étalonnage. *Immunoanal*", *BioLSpéc.* (1989) 15, 19-22.

- **Hanzen C, Laurent Y, Lambert E, Delsaux B, Ectors F.1990.** Etude épidémiologique de l'infécondité bovine.2.L'évaluation des performances de reproduction. *Ann Méd.Vet.*,134:105-114.
- **Janin, J., 1995.** « Elusive affinities. » ; *Proteins.* 1995 Jan ; 21(1):30-9. doi: 10.1002/prot.340210105.
- **Kiyoshi O., Yoshihisa U., Bajram B., Iris G. Lange, Hiroaki T., Shinya K., Shu-ichi K., Akio M. and Dieter S., 2001.** Estradiol-17b Is Produced in Bovine Corpus Luteum1. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 65, 1634–1639.
- **Lee, Hwashim., Park, C.J., Lee, G., 2010**"Measurement of progesterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with the commercial chemiluminescence immunoassay", *Anal BioanalChem* 396 ,1713-1719.
- **Latapie, M.J., (1989)** " Les anticorps : Les immunodosages de la théorie à la pratique", Chapitre 1, Ed ACOMEN, 1989, 249p, ISBN : 2-907794-00-0.
- **Lupi-Chen, N., Hoang, B.M., Cailla, H., 1999.** "Immunodosage des stéroïdes : testostérone, progestérone et cortisol chez les animaux",*ImmunoanalBiolSpéc*, 269-275.
- **Mann et al., 2005.** The use of milk progesterone to monitor reproductive function in beef suckler cows.
- **Massart, C., 2009** . *Immunoanalyse: De la théorie aux critères de choix en biologie clinique* .ed : EDP Sciences, ISBN : 2759809021, 260pp
- **Mauffré, Vincent, Fabienne Constant, et Laurent Tiret., 2016.** « Cycle sexuel de la vache ». *Reproduction animale*.
- **Meisterling, E.M., Dailey, R.A., 1987.** "Use of concentrations of progesterone and estradiol-17beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows", *J. Dairy Sci.* 2154–2161.
- **Meurant, G., 1995.**"Handbook of milk composition", *Food Science and Technology*. Ed: Academic Press .ISBN: 0080533116.
- **Miroud, K., Hadeif, A., Khelef, D., Ismail, S., Kaidi, R., 2014.** “ Bilan de reproduction de la vache laitière dans le Nord-Est de l’Algérie.” *LivestockResearch for Rural Development* 26(6).
- **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., 2009** "Serum progesterone as an indicator of cyclic activity in post-partym goat does", *South African Journal of Animal Science* 39 Supplement 1 ,306-311.

- **Mohan, C., 2003.** "Buffers", A guide for the preparation and use of buffers in biological systems, Calbiochem, EMD, Biosciences, Inc. 32p.
- **Nicolas, O., Farenc, C., Bressolle, F., 2004.** «Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques» *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XVI, n° 2, 118-127.
- **Oku, Y., Osawa, T., Hirata, T.I., Kon, N., Akasaka, S., Senosy, W.S., Takahashi, T., Izaïke, Y., 2011.** "Validation of a direct time-resolved fluoroimmunoassay for progesterone in milk from dairy and beef cows." *The Veterinary Journal* 190, 244–248.
- **Peters, A.R. et Ball, P.J.H., 1995.** "Reproduction in cattle", second edition – UK: Blackwell Science. 234 p.
- **Regal, P., Cepeda, A., Fente, C., 2012.** "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, 770–779
- **Saidi, R., Khelef, D., Kaidi, R., 2012.** "Analyse descriptive des résultats d'insemination artificielle bovine en Algérie: Cas de la région centre" *Livestock Research for Rural Development* 24 (10) .
- **Samuel, G., Kabir, T., Kothari, K., Joshi, S., Sivaprasad, N., Venkatesh, M., 2006.** Development of Radioimmunoassay for estimation of progesterone in bovine serum. Development of radioimmunometric assays and kits for non-clinical applications. AEA, VIENNA, IAEA-TECDOC-1498 ISBN 92-0-106006-8 ISSN 1011-4289 .
- **Sapin, R., 2008.** "Mise au point, Interférences dans les immunodosages : mécanismes et conséquences en endocrinologie", *Annales d'Endocrinologie* 69 415-425.
- **Saumande, J., 1991.** La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec.Méd.Vét.*, 1991, 167, 205-218.
- **Schiettecatte, J., Anchaert, E., Smitz, J., 2012.** "Interferences in Immunoassays", Chapitre 3 in *Advances in Immunoassay Technology*, Ed Dr Norman H.L. Chiu ISBN, 978-953-51-0440-7.
- **Schwickart, M., Vainshtein, I., Lee, R., Schneider, A., Liang, M., 2014.** «Interference in immunoassays to support therapeutic antibody development in preclinical and clinical studies *Bioanalysis*» .6(14), 1939–1951.
- **Shahin, M., Friedrich M., Gauly, M., Beckers, J.F., Holtz, W.H., 2013.** Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera.

- **Short, R.E., Bellows, R.A., Staigmiller, R.B., 1990.** Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J.Anim.Sci.*
- **Shrestha, H.K., Nakao, T., Higaki, T., Suzuki, T., Akita, M., 2004.** “Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows.” *Theriogenology* 61 637–649.
- **Szelényi, Z., Répási, A., De Sousa, N.M., Beckers, J.F. et Szenci, O., 2015.** "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 ,1–6.
- **Tate, J., Ward, G., 2004.** Interferences in Immunoassay. Review Article. *ClinBiochem Rev* Vol 25 May 2004, 105-120.
- **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
- **Thimonier, J., 2000.** "Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone", *INRA Prod. Anim.*, 13 (3), 177-183.
- UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006.
- **WIKIPEDIA, L'ENCYCLOPÉDIE LIBRE.** Anticorps. [En ligne]. Disponible sur : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Anticorps> >.
- **Wood, P.J. et Gower, D.B., 2010.** "Analysis of Progestagens", Chapitre 7 in *Steroid Analysis*, H.L.J. Makin and D.B. Gower (eds.), 559-603. DOI 10.1023/b135931_7, © Springer Science + Business Media B.V.
- **Yalow, R. et Berson, S., 1959.** "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological method", *Nature*, 1648-1649.
- **Yu, S.J. et Li, F.D., 2001.** "Profiles of plasma progesterone before and at the onset of puberty in yak heifers", *Animal Reproduction Science* 65 ,67–73
- **Zineddine, E., Bendahmane, M., Khaled, M.B., 2010.** “ 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).

Annexes

Courbe standard " Immunotach " "136 échantillons"

BERUN (#) MODIFIED RQN DATE/TIME 16/10/2016 15:12
 #14 protein LBC111-12

DILUTION-FACTOR 1.000 LOWER THR. 0.00 UPPER THR. 0.00 ng/ml SOUND

ID #	cpm	cpm	SD.V.	AVG-cpm	DELETED	IS/BO
1	75872.7	39611.0	0.12	35641.9		TC
3	19499.9	19837.5	1.21	19668.7		80 * IS/BO/TC 55.2 *
5	16787.0	17112.0	3.05	16749.5		85.16
7	13354.0	13809.8	2.37	13581.9		69.05
9	7353.5	7465.6	1.07	7409.5		37.67
11	3128.5	3086.2	0.96	3107.4		15.80
13	1159.3	1219.0	3.55	1189.2		6.05

AUTOMATIC SMOOTHED CUBIC SPLINE

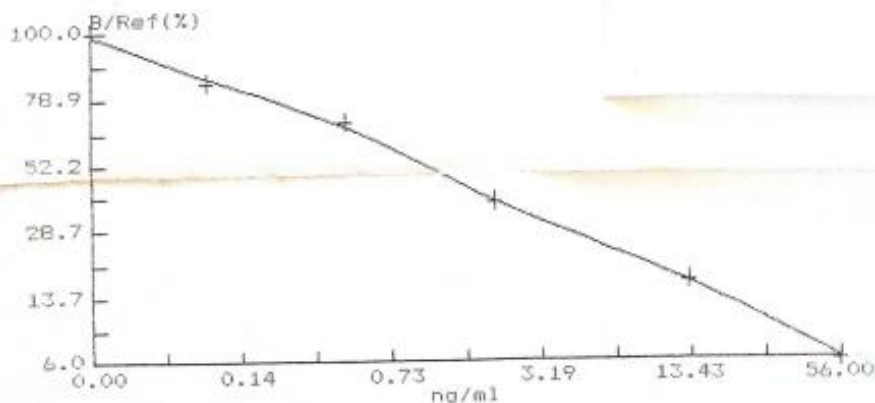
SMOOTHING FACTOR 0.125

STANDARD-CONCENTR.	RECALC. CONCENTR.	PERCENT DEVIATION
0.00	OFF CURVE-	
0.09	0.11	19.22
0.45	0.41	-9.69
2.00	2.06	3.13
13.00	12.84	-1.27
56.00	56.25	0.45

GOODNESS OF FIT 0.1258

ESTIMATED DOSES

20 IS/BO =^	8.17 ng/ml	
50 IS/BO =^	1.09 ng/ml	
80 IS/BO =^	0.18 ng/ml	
MIN. CONC.	0.00 ng/ml	=^ 99.50 IS/BO
MAX. CONC.	224.00 ng/ml	=^ 2.23 IS/BO
DET. LIMIT	0.05 ng/ml	=^ 90.75 IS/BO



Conte standard Immunotach

*136 échantillons
2 cartouges*

TO #	CONC.	NO. V.	13/60	CONC.	AVE CONC.	PAT #
15	9285.5	47.20	1.25*	(1.25*)	control	1
16	10216.2	51.94	0.99*	0.99*		2
17	13682.2	69.56	0.79*	0.79*		3
18	14407.2	71.25	0.71*	0.71*		4
19	15168.0	77.17	0.23*	0.23*		5
20	15953.0	80.91	0.41*	0.41*		6
21	15980.7	80.74	0.17*	0.17*		7
22	4034.1	29.51	7.76*	7.76*		8
23	14815.8	75.77	0.26*	0.26*		9
24	12928.1	85.73	0.49*	0.49*		10
25	15154.3	77.05	0.23*	0.23*		11
26	13556.4	68.92	0.41*	0.41*		12
27	12605.4	67.14	0.40*	0.40*		13
28	1715.2	18.89	9.14*	9.14*		14
29	5172.1	16.13	12.36*	12.36*		15 - 43
30	3678.5	18.90	9.54*	9.54*		16
31	5717.8	14.67	9.15*	9.15*		17
32	2894.5	44.67	14.64*	14.64*		18
33	7867.4	46.09	1.81*	1.81*		19
34	8978.3	45.45	1.35*	1.35*		20
35	56386.2	83.21	0.13*	0.13*		21
36	14415.4	73.29	0.31*	0.31*		22
37	13469.5	68.18	0.43*	0.43*		23
38	13654.4	69.42	0.40*	0.40*		24
39	14653.2	74.41	0.28*	0.28*		25
40	16057.1	51.13	1.03*	1.03*		26
41	15373.2	78.16	0.21*	0.21*		27
42	3475.1	18.69	9.36*	9.36*		28
43	14281.0	72.61	0.32*	0.32*		29
44	14583.4	74.15	0.29*	0.29*		30
45	14527.1	73.86	0.30*	0.30*		31
46	15498.0	78.75	0.26*	0.26*		32
47	2289.8	11.74	21.13*	21.13*		33
48	12413.4	67.11	0.57*	0.57*		34
49	15157.6	78.08	0.21*	0.21*		35
50	2264.7	11.51	21.80*	21.80*		36
51	2183.3	16.18	12.29*	12.29*		37
52	3865.4	19.45	8.46*	8.46*		38
53	3082.0	15.47	13.03*	13.03*		39
54	4032.9	20.50	7.77*	7.77*		40
55	4497.0	22.86	6.19*	6.19*		41
56	6274.7	31.98	2.98*	2.98*		42
57	13890.3	70.42	0.37*	0.37*		43
58	15135.7	76.95	0.23*	0.23*		44
59	17441.6	88.48	0.07*	0.07*		45
60	17244.5	68.79	0.57*	0.57*		46
61	18498.9	58.22	0.72*	0.72*		47
62	13725.4	67.24	0.45*	0.45*		48
63	12580.6	63.86	0.53*	0.53*		49
64	16904.9	81.38	0.16*	0.16*		50
65	13722.8	69.77	0.39*	0.39*		51
66	12029.2	63.28	0.51*	0.51*		52
67	5657.8	18.59	9.45*	9.45*		53
68	8755.5	44.51	1.42*	1.42*		54
69	15198.9	77.27	0.25*	0.25*		55
70	14257.7	72.49	0.28*	0.28*		56
71	2135.4	15.92	12.67*	12.67*		57
72	3922.4	17.91	19.16*	19.16*		58
73	17250.8	87.97	0.44*	0.44*		59
74	2479.6	18.77	9.26*	9.26*		60
75	4162.2	21.16	7.28*	7.28*		61
76	3824.6	19.40	8.65*	8.65*		62
77	8791.5	44.70	1.41*	1.41*		63

Courbe standard TP +50 ul SBD "136 échantillons"

1	35790.5	35179.2	1.22	35484.9	TC
2	12621.4	12767.3	0.81	12694.3	80
5	9516.2	9196.1	2.68	9333.2	73.52
7	7158.0	7510.1	3.39	7334.0	57.77
9	5772.1	5661.6	1.37	5716.9	45.03
11	4481.4	4240.8	3.90	4361.1	34.35
13	3035.5	2977.6	3.78	2956.6	23.29
15	1878.0	2017.8	4.93	1945.9	15.33
17	1336.5	1340.0	0.18	1338.3	10.54

AUTOMATIC SMOOTHED CUBIC SPLINE

SMOOTHING FACTOR 0.125

STANDARD-CONCENTR.	RECALC. CONCENTR.	PERCENT DEVIATION
0.00	OFF CURVE-	
0.49	0.47	-4.15
1.11	1.25	12.37
3.00	2.80	-6.65
5.48	5.58	1.85
12.67	12.25	-3.35
24.49	24.38	-0.46
41.23	42.59	3.08

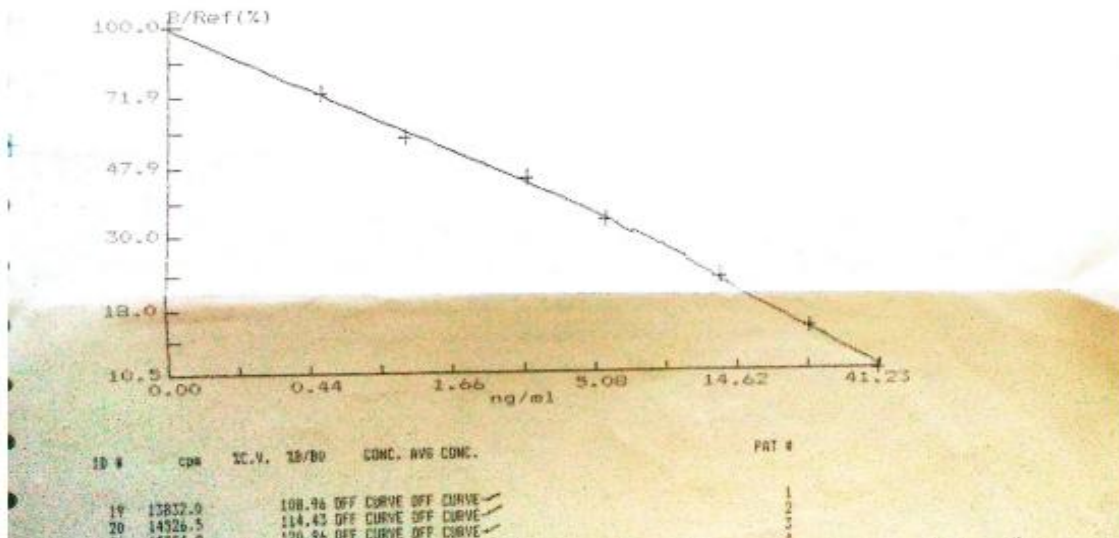
GOODNESS OF FIT 0.0691

ESTIMATED DOSES

20 XB/80 ="	15.94	ng/ml	
50 XB/80 ="	2.04	ng/ml	
80 XB/80 ="	0.30	ng/ml	
MIN. CONC.	0.60	ng/ml ="	99.81 XB/80
MAX. CONC.	164.92	ng/ml ="	4.06 XB/80
DET. LIMIT	0.11	ng/ml ="	90.24 XB/80

*TP + 50ul SBD
Curve Standard*

136 échantillons

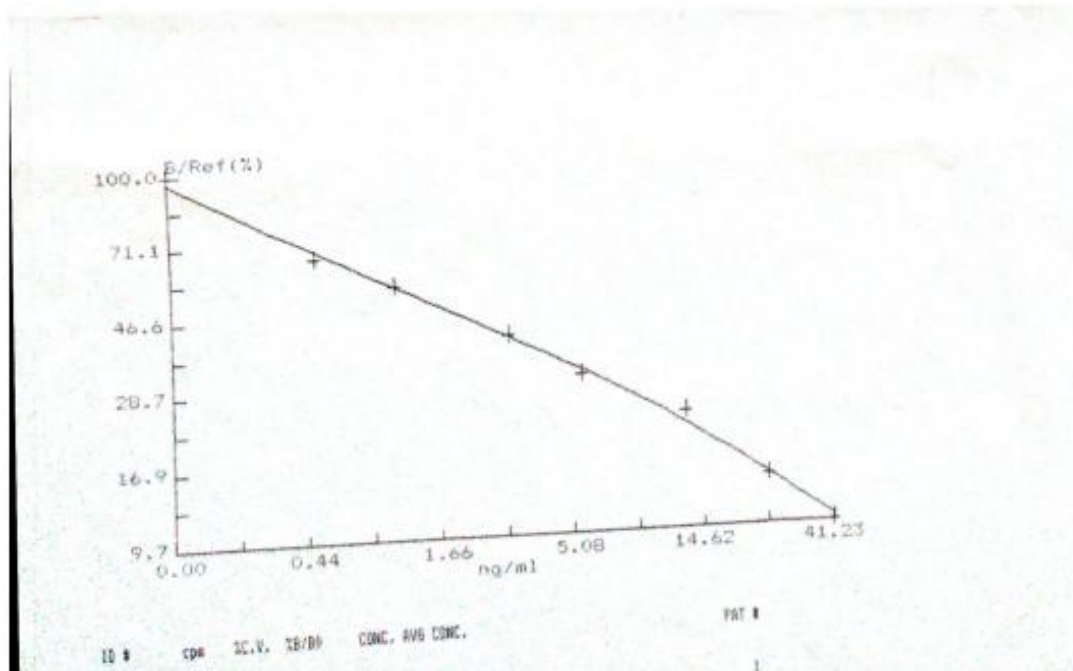
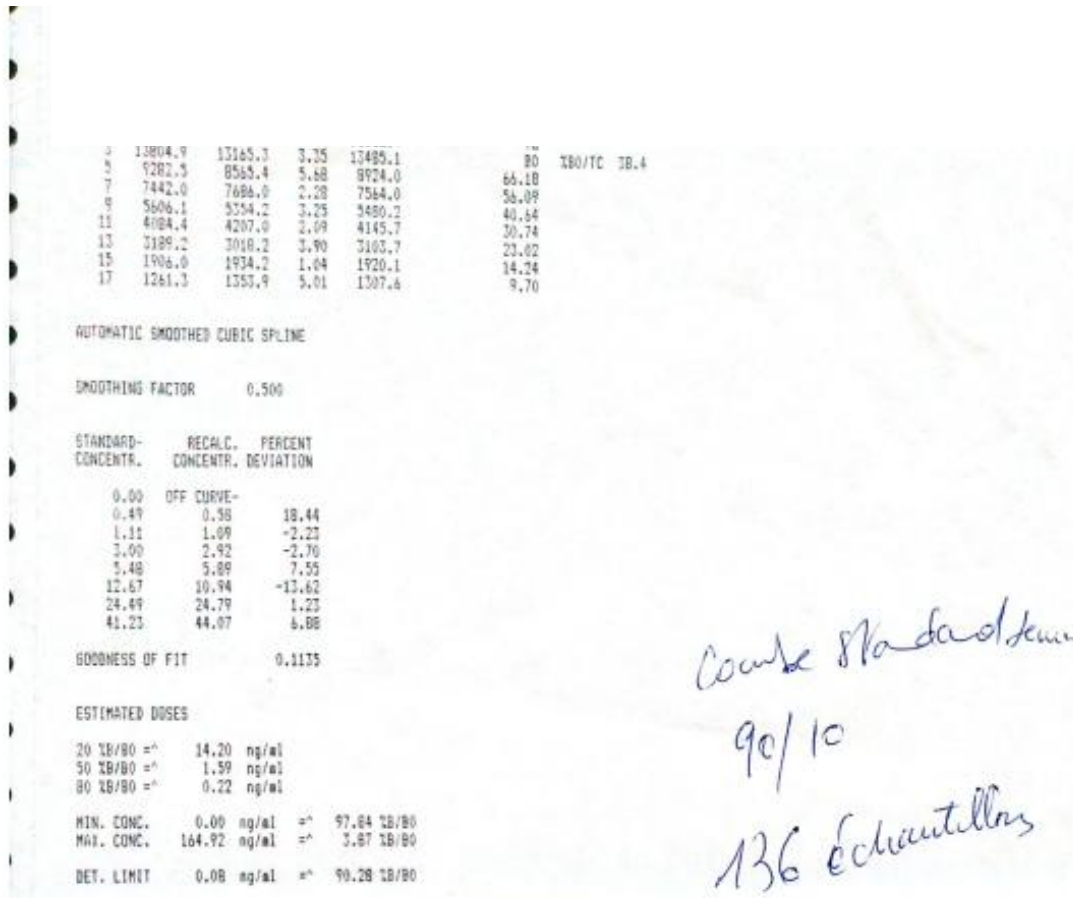


Annexes

ID #	con	CC.V.	TR/FO	CONC.	HAS	CONC.	PAG #
19	12872.0	108.96	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		1
20	14926.4	114.43	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		2
21	15754.8	120.96	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		3
22	17410.5	105.64	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		4
23	19327.8	122.52	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		5
24	2794.8	31.17	6.92+	6.92+	6.92+		6
25	13279.2	120.55	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		7
26	12889.0	101.32	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		8
27	14948.5	117.76	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		9
28	13734.4	108.19	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		10
29	12618.8	107.28	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		11
30	1609.5	26.59	8.28+	8.28+	8.28+		12
31	1609.0	24.26	11.37+	11.37+	11.37+		13
32	3746.1	29.31	7.76+	7.76+	7.76+		14
33	3742.7	29.64	7.69+	7.69+	7.69+		15
34	2765.9	21.79	13.70+	13.70+	13.70+		16
35	7890.3	82.16	0.95+	0.95+	0.95+		17
36	8708.2	86.80	0.64+	0.64+	0.64+		18
37	14559.2	120.45	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		19
38	14022.8	110.47	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		20
39	13795.0	108.67	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		21
40	14054.8	110.72	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		22
41	14416.8	113.57	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		23
42	9423.3	78.18	0.34+	0.34+	0.34+		24
43	15048.0	118.70	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		25
44	3782.0	29.79	7.61+	7.61+	7.61+		26
45	14467.1	113.96	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		27
46	14619.8	115.33	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		28
47	14411.9	113.53	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		29
48	14980.0	118.01	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		30
49	2216.7	17.54	19.75+	19.75+	19.75+		31
50	11956.1	94.18	0.04+	0.04+	0.04+		32
51	15709.8	120.57	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		33
52	2330.2	18.36	18.36+	18.36+	18.36+		34
53	2306.8	26.00	9.98+	9.98+	9.98+		35
54	2687.0	29.84	8.02+	8.02+	8.02+		36
55	2038.0	23.92	11.66+	11.66+	11.66+		37
56	4033.9	31.78	6.64+	6.64+	6.64+		38
57	4624.4	36.43	4.87+	4.87+	4.87+		39
58	6038.7	47.57	2.38+	2.38+	2.38+		40
59	13756.2	108.36	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		41
60	14888.6	117.29	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		42
61	17499.9	137.54	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		43
62	12621.6	99.42	0.00+	0.00+	0.00+		44
63	11687.4	92.97	0.09+	0.09+	0.09+		45
64	13336.4	105.96	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		46
65	12232.8	96.26	0.04+	0.04+	0.04+		47
66	16083.2	126.49	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		48
67	17504.0	166.38	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		49
68	12891.4	100.64	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		50
69	3612.8	28.85	8.13+	8.13+	8.13+		51
70	9012.2	70.92	0.56+	0.56+	0.56+		52
71	15338.2	120.83	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		53
72	14232.0	112.12	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		54
73	3203.2	25.23	10.57+	10.57+	10.57+		55
74	3473.8	27.26	9.04+	9.04+	9.04+		56
75	13619.3	107.29	OFF CURVE	OFF CURVE	OFF CURVE		57
76	1711.2	27.24	7.91+	7.91+	7.91+		58
			4.00+	4.00+	4.00+		59
							60
							61
							62
							63
							64
							65
							66
							67
							68
							69
							70
							71
							72
							73
							74
							75
							76
							77
							78
							79
							80
							81
							82
							83
							84
							85
							86
							87
							88
							89
							90
							91
							92
							93
							94
							95
							96
							97
							98
							99
							100

Valeurs à multiplier
par 10⁴

Courbe standard sérum reconstitué dans du SBD (à 90%) "136 échantillons"



Annexes

ID #	cpm	%V.	18/80	CONC.	AVG CONC.	PAT #	
19	13864.0	102.81	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	1
20	14536.4	107.94	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	2
21	15144.9	112.31	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	3
22	13693.9	101.55	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	4
23	15749.0	116.79	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	5
24	3974.5	29.47	6.50+	6.50+	6.50+	6.50+	6
25	15283.1	113.33	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	7
26	12760.2	94.62	0.03+	0.03+	0.03+	0.03+	8
27	15371.6	113.99	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	9
28	13833.9	102.59	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	10
29	13533.7	100.36	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	11
30	3619.6	26.84	7.99+	7.99+	7.99+	7.99+	12
31	3046.0	22.99	11.35+	11.35+	11.35+	11.35+	13
32	3666.1	27.19	7.77+	7.77+	7.77+	7.77+	14
33	4090.6	30.33	6.08+	6.08+	6.08+	6.08+	15
34	2552.4	18.93	15.63+	15.63+	15.63+	15.63+	16
35	7815.3	57.96	0.97+	0.97+	0.97+	0.97+	17
36	9016.2	66.86	0.56+	0.56+	0.56+	0.56+	18
37	16878.8	125.17	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	19
38	14404.0	106.81	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	20
39	13407.8	99.43	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	21
40	13684.7	101.48	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	22
41	14046.5	104.16	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	23
42	9756.7	72.37	0.39+	0.39+	0.39+	0.39+	24
43	14884.0	110.37	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	25
44	3690.1	27.36	7.56+	7.56+	7.56+	7.56+	26
45	14607.1	108.32	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	27
46	14196.8	105.28	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	28
47	14342.3	107.84	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	29
48	15540.4	115.24	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	30
49	2338.5	17.34	18.11+	18.11+	18.11+	18.11+	31
50	12124.5	89.91	0.68+	0.68+	0.68+	0.68+	32
51	15130.1	112.20	OFF	CURVE	OFF	CURVE-	33
52	2244.6	16.65	19.36+	19.36+	19.36+	19.36+	34
53	3467.1	25.71	8.75+	8.75+	8.75+	8.75+	35
54	3665.8	26.74	8.06+	8.06+	8.06+	8.06+	36
55	3002.0	22.26	11.67+	11.67+	11.67+	11.67+	37

Annexes

Courbe standard sérum reconstitué dans du SBD (à 50%) "136 échantillons"

DILUTION-FACTOR	1.000	LOWER THR.	0.00	UPPER THR.	0.00 ng/ml	BOUND
ID #	con	cpm	%C.V.	AVG-cpm	DELETED	%B/B0
1	35782.5	35313.9	0.93	35548.2		TC
3	17058.1	16420.8	2.69	16739.4		B0 %B0/TC 47.1
5	9858.9	9275.1	4.17	9557.0		57.09
7	8188.0	8061.8	1.10	8124.9		48.54
9	6113.9	6160.5	0.54	6137.2		36.66
11	4094.3	4658.1	9.11	4376.2		26.14
13	2917.6	3152.9	5.48	3035.3		18.13
15	1975.8	2087.4	3.88	2031.6		12.14
17	1233.6	1288.5	3.08	1261.1		7.83

AUTOMATIC SMOOTHED CUBIC SPLINE

SMOOTHING FACTOR 1.000

STANDARD-CONCENTR.	RECALC. CONCENTR.	PERCENT DEVIATION
0.00	OFF CURVE-	
0.49	0.65	33.03
1.11	1.13	1.72
3.00	2.61	-13.14
5.48	5.84	6.54
12.67	11.94	-5.76
24.49	22.97	-6.22
41.23	49.60	19.59

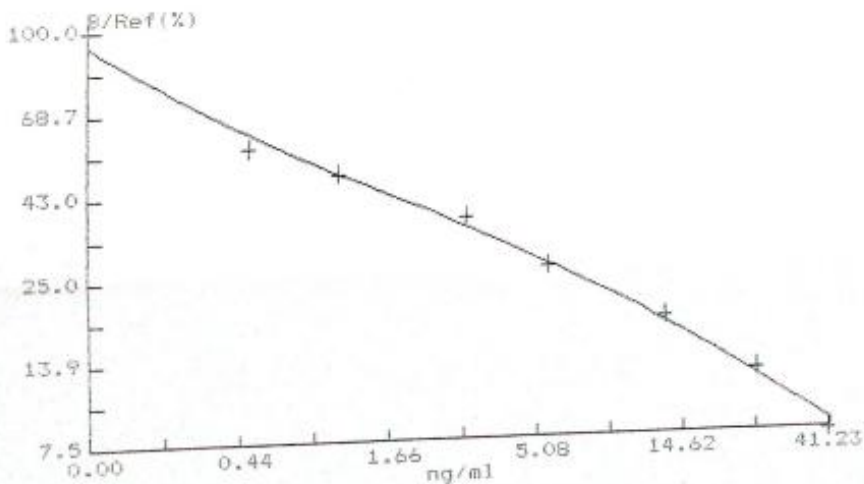
GOODNESS OF FIT 0.1728

ESTIMATED DOSES

20 %B/B0 =^	9.99 ng/ml
50 %B/B0 =^	1.02 ng/ml
80 %B/B0 =^	0.14 ng/ml

MIN. CONC.	0.00 ng/ml	=^	94.78 %B/B0
MAX. CONC.	164.92 ng/ml	=^	2.96 %B/B0
DET. LIMIT	0.03 ng/ml	=^	90.42 %B/B0

*Courbe Standard
50/50
136 échantillons*



ID # cpm %C.V. %B/B0 CONC. AVG CONC.

PAT #

Annexes

ID #	cpm	U.V. 19/90	COND. AWS COND.	PAT #	
19	17514,0	89,73	0,13*	0,13*	1
20	14302,3	85,92	0,08*	0,08*	2
21	17536,8	92,82	0,01*	0,01*	3
22	13446,3	89,33	0,14*	0,14*	4
23	17916,9	93,09 OFF	CURVE OFF	CURVE-	5
24	3665,2	23,09	7,36*	7,36*	6
25	15917,5	89,71	0,04*	0,04*	7
26	12821,6	76,60	0,18*	0,18*	8
27	15070,3	89,84	0,04*	0,04*	9
28	13981,2	83,92	0,10*	0,10*	10
29	13674,7	81,45	0,12*	0,12*	11
30	3764,9	22,13	0,22*	0,22*	12
31	2112,0	18,59	11,42*	11,42*	13
32	3664,1	21,89	8,40*	8,40*	14
33	2836,7	21,92	7,67*	7,67*	15
34	2835,0	16,94	15,45*	15,45*	16
35	2815,3	46,65	1,28*	1,28*	17
36	8976,5	57,62	0,81*	0,81*	18
37	16333,3	93,77 OFF	CURVE OFF	CURVE-	19
38	14433,7	86,23	0,07*	0,07*	20
39	17669,2	81,68	0,12*	0,12*	21
40	13672,7	81,68	0,12*	0,12*	22
41	14331,7	85,62	0,08*	0,08*	23
42	8935,2	59,33	0,57*	0,57*	24
43	15834,0	89,81	0,04*	0,04*	25
44	3698,1	22,09	8,29*	8,29*	26
45	14447,1	86,31	0,07*	0,07*	27
46	14182,4	85,92	0,08*	0,08*	28
47	14267,7	85,23	0,08*	0,08*	29
48	14979,9	89,28	0,04*	0,04*	30
49	2748,5	14,63	18,25*	18,25*	31
50	12112,8	72,36	0,29*	0,29*	32
51	15687,0	93,59	0,01*	0,01*	33
52	2266,3	17,54	15,41*	15,41*	34
53	3140,4	18,76	11,23*	11,23*	35
54	3689,0	22,04	8,29*	8,29*	36
55	2920,0	17,44	12,78*	12,78*	37
56	4183,4	24,52	5,89*	5,89*	38
57	4644,4	27,75	5,13*	5,13*	39
58	6098,8	36,43	2,65*	2,65*	40
59	13570,5	81,07	0,13*	0,13*	41
60	14872,7	86,89	0,05*	0,05*	42
61	17951,0	104,85 OFF	CURVE OFF	CURVE-	43
62	12786,2	76,01	0,19*	0,19*	44
63	17446,9	86,49	0,10*	0,10*	45
64	17889,1	76,52	0,19*	0,19*	46
65	13823,4	55,73	0,27*	0,27*	47
66	16862,4	85,96 OFF	CURVE OFF	CURVE-	48
67	17884,0	80,59	0,15*	0,15*	49
68	17851,3	76,77	0,18*	0,18*	50
69	3872,7	25,14	7,53*	7,53*	51
70	8896,3	52,15	0,88*	0,88*	52
71	15584,8	81,42	0,12*	0,12*	53
72	13992,7	85,59	0,10*	0,10*	54
73	3881,4	18,41	11,62*	11,62*	55
74	3582,8	21,72	8,05*	8,05*	56
75	11377,9	79,42	0,14*	0,14*	57
76	3963,9	23,40	7,17*	7,17*	58
77	4239,3	25,33	6,25*	6,25*	59
78	2936,8	23,52	7,28*	7,28*	60
79	4086,8	23,48	0,50*	0,50*	61
80		26,29	0,13*	0,13*	62
81					63
82					64
83					65
84					66
85					67
86					68
87					69
88					70
89					71
90					72
91					73
92					74
93					75
94					76
95					77
96					78
97					79
98					80
99					81
100					82
101					83
102					84
103					85
104					86
105					87
106					88
107					89
108					90
109					91
110					92
111					93
112					94
113					95
114					96
115					97
116					98
117					99
118					100