

AIGx

AIALv

SEMINAIRES DE PERFECTIONNEMENT

METHODES MODERNES

D'ANALYSE CHIMIQUE

6 janvier - 17 mars 1978

Deuxième thème : Présentation des méthodes enzymatiques et radioimmunologiques.

- a. Propriétés des enzymes. A. GOFFEAU
- b. Principes de l'analyse enzymatique. F. HILGER
- c. Dosage enzymatique dans les industries alimentaires. P. THONART
- d. Les dosages radioimmunologiques. Principes généraux. J. FABRY
- e. Marquage d'un antigène et purification du produit marqué. C. TIXHON
- f. Contrôle de qualité du dosage radioimmunologique des hormones. C. SAUSSEZ
- g. Dosages radioimmunologiques. Applications en médecine vétérinaire. J.F. BECKERS et F. ECTORS
- h. Dosages radioimmunologiques. Intérêt en zootechnie. Application à la détermination des hormones thyroïdiennes. J. FABRY

DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES

APPLICATIONS EN MEDECINE VETERINAIRE

BECKERS J.F. et ECTORS F.

Chaire d'Obstétrique

Faculté de Médecine Vétérinaire

Université de Liège

45, rue des Vétérinaires, 1070 BRUXELLES

Les études faisant partie de cet exposé ayant spécialement trait à la vache, il nous paraît important de rappeler brièvement le déroulement du cycle oestral dans cette espèce.

La puberté se situe vers l'âge d'un an (4-16 mois), le cycle a une durée de 21 jours, l'oestrus est de courte durée en moyenne de 14 à 15 heures, c'est durant cette période que la vache accepte la saillie.

L'ovulation se produit en moyenne 16 heures après la fin de l'oestrus. Elle est suivie de l'établissement du corps jaune. Ce dernier commence à sécréter de la progestérone à partir du Jour 3 après l'ovulation pour atteindre une sécrétion maximale au Jour 7 ou 8. Son activité se réduit très rapidement au Jour 17-18 (en \pm 12 heures) pour céder la place à une nouvelle vague folliculaire dont un ou deux follicules arriveront à maturité.

Il faut signaler qu'on peut, à tout moment, suivre le déroulement des différentes phases du cycle par fouiller rectal.

Le follicule présente une surface lisse et dépressible, tandis qu'au contraire le corps jaune présente une surface irrégulière et une consistance plus prononcée.

La durée de la gestation est en moyenne de 282 jours (282,4 jours pour les veaux mâles et 281,3 jours pour les veaux femelles).

Après ce bref résumé de la physiologie, nous envisagerons l'application de quelques dosages hormonaux; deux stéroïdes : la progestérone et le $17\text{-}\beta$ oestradiol et deux gonadotropines : la LH et la FSH.

1. PROGESTERONE

1.1. DOSAGE

Les premiers dosages en série de la progestérone plasmatique ont été réalisés par la technique du "Protein Binding", cette méthode est basée sur la liaison du stéroïde avec sa protéine transporteuse. En effet, dans l'organisme, les stéroïdes sont transportés par des protéines spécifiques : la testostérone et les oestrogènes sont liés à la S.B.P. (sex Binding Protein) qui est une beta globuline. Le cortisol est lié à la transcortine qui est une δ I-glycoprotéine. Enfin, la progestérone peut être liée à son transporteur spécifique : la P.B.G. (Progesterone Binding Globuline) mais également à la transcortine et même à l'albumine.

La technique de dosage par "Protein Binding" a permis d'établir les normes sanguines de plusieurs stéroïdes. Toutefois, elle reste d'application délicate, c'est pourquoi elle a disparu au profit du radioimmunoassay à la fois plus sensible et plus reproductible, mais dont la principale difficulté réside dans l'obtention d'un anti-sérum spécifique. En effet, les stéroïdes étant de très petites molécules doivent être couplés à des protéines pour provoquer la formation d'anticorps. Actuellement, le couplage se fait le plus souvent sur l'albumine du sérum de boeuf (B.S.A.) ou l'albumine du sérum de lapin (R.S.A.) à partir d'un dérivé soit carboxyméthylxime ou hémisuccinate du stéroïde.

Les meilleurs résultats sont obtenus quand le couplage se fait le plus loin des sites différentiels de l'hormone : par exemple pour la progestérone, le couplage en position 3 donne des anticorps qui la différencient bien de la $17\text{-}\beta$ OH Progestérone et du cortisol mais moins bien de la prégnénone (Tableau n° 1, page 4).

Une fois l'antisérum obtenu, le dosage de la progestérone se réalise par la technique classique du R.I.A. précédée d'une extraction à l'éther de pétrole ou à l'hexane.

Chez la vache, les valeurs du taux de progestérone en fonction du cycle oestral peuvent se résumer comme suit : (Schéma n° 2, page 4)

- Taux de base inférieur à un nanogramme/ml du Jour -2 au Jour +4
- Ascension de 1 à 4,3 ng/ml du Jour + 4 au Jour +7
- Taux maxima de 4,3 à 8 ng/ml du Jour +8 au Jour 17-18 suivant la longueur du cycle
- Chute de 5 à 1 ng/ml du Jour -3 au Jour - 2.

Durant la gestation, le taux de progestérone se situe entre 4 et 7 ng/ml.

1.2. APPLICATIONS PRATIQUES

1.2.1. DIAGNOSTIC DE GESTATION

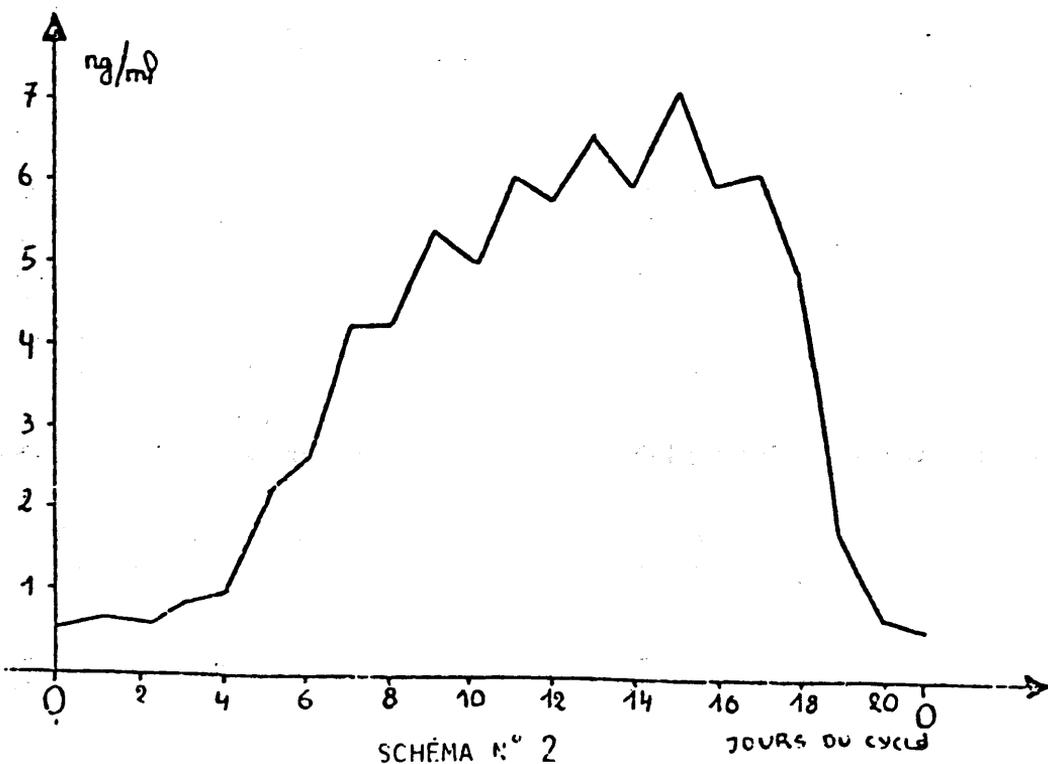
Le diagnostic précoce de gestation chez la vache est basé sur la détermination du taux de progestérone dans le sang ou le lait entre le 19ème et le 24ème jour après la saillie. Durant cette période, si la vache est gestante, le taux reste élevé, dans le cas contraire, il redescend à sa valeur de base.

Taux de progestérone plasmatique dans différentes espèces :

TAUX DE BASE	TAUX MESURÉS DURANT LA PHASE D'ACTIVITÉ DU CORPS JAUNE
Vache 0,3 - 1	4 à 8 nanogramme
Jument 0,3 - 1	4 à 8 nanogramme
Brebis 0,2 - 0,3	2,5 à 3 nanogramme
Truie + 1	+ 30

TABLEAU N° 1.- SPECIFICITE ANTI-PROGESTERONE N° 106

Deoxycorticostérone	3,5 %
5- β -Pregnan-3,20 dione	3 %
20-Hydroxy- Δ^4 -Pregnan-3-one	4,3 %
Prégnénone	3 %
17 α -Hydroxy-progestérone	1 %
17 β -Hydroxy-progestérone	0,63 %
Testostérone	0,08 %
Cortisol	0,01 %
17 β -oestradiol	0,01 %



Les variations du taux de progestérone dans le lait sont parallèles à celles observées dans le plasma (Schéma 3, page 6). Si le prélèvement de l'échantillon de lait est beaucoup plus simple, le dosage en lui-même s'avère plus compliqué suite à la présence de la matière grasse du lait : les graisses extraites en même temps que les stéroïdes modifient la pente de la courbe d'étalonnage. En outre, le taux de la progestérone varie en fonction du taux de la matière grasse si bien qu'il faut en tenir compte ou plus simplement doser la progestérone contenue dans la graisse ainsi que HOFFMAN l'a proposé récemment (1977). Les résultats paraissent très favorables, toutefois un certain pourcentage d'erreur peut s'expliquer par la mortalité embryonnaire et par la possibilité d'un cycle oestral allongé ou raccourci (26-27 jours ou 17-18 jours). Le diagnostic précoce de la gestation chez la vache et dans d'autres espèces revêt un intérêt économique réel en raccourcissant le délai entre deux mises-bas successives.

1.2.2. L'ANOESTRUS

L'anoestrus se caractérise par l'absence de toute manifestation oestrale chez un sujet porteur d'ovaires inactifs et d'un tractus génital au repos. On retrouve cet état principalement chez les génisses en hiver, et chez les vaches durant la période post-partum. Chez les génisses, l'examen clinique réalisé par fouiller rectal, révèle la présence d'ovaires petits au repos sans aucun follicule ni corps jaune. Le tractus génital est le plus souvent peu développé. Les résultats des dosages de progestérone confirment l'absence totale de corps jaune. (Tableau n° 4, page 6). L'anoestrus du post-partum présente une durée moyenne de 30 à 45 jours. Dans certaines conditions d'exploitation déficientes, cet anoestrus se prolonge jusqu'à 100 à 120 jours (Schéma 5, page 7).

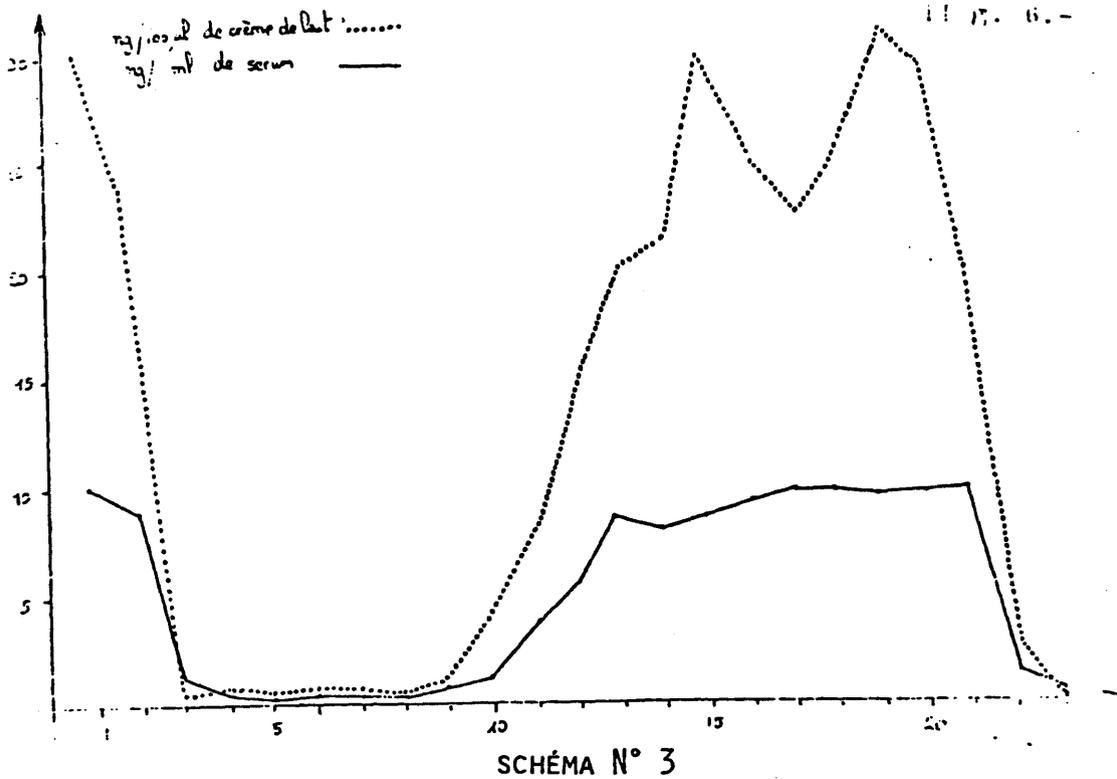


TABLEAU N° 4.- ANOESTRUS FONCTIONNEL DE GENISSES EN PERIODE HIVERNALE

	<u>PROGESTÉRONE (NG/ML)</u>	<u>17 B OESTRADIOL (PG/ML)</u>
Génisse n° 1	0,43	2,05
Génisse n° 2	0,16	2,8
Génisse n° 3	0,41	2,8
Génisse n° 4	0,24	2,9
Génisse n° 5	0,18	1,6
Génisse n° 6	1,39	2,0
Génisse n° 7	0,28	1,5
Génisse n° 8	0,27	1,3
Génisse n° 9	0,39	2,4
Génisse n° 10	0,49	2,4
Génisse n° 11	0,80	2,8
Génisse n° 12	0,60	3,0
Génisse n° 13	0,75	3,1
Génisse n° 14	0,16	1,79
Génisse n° 15	0,44	1,96
Génisse n° 16	0,30	1,67
Génisse n° 17	0,24	1,68
Génisse n° 18	0,23	1,37

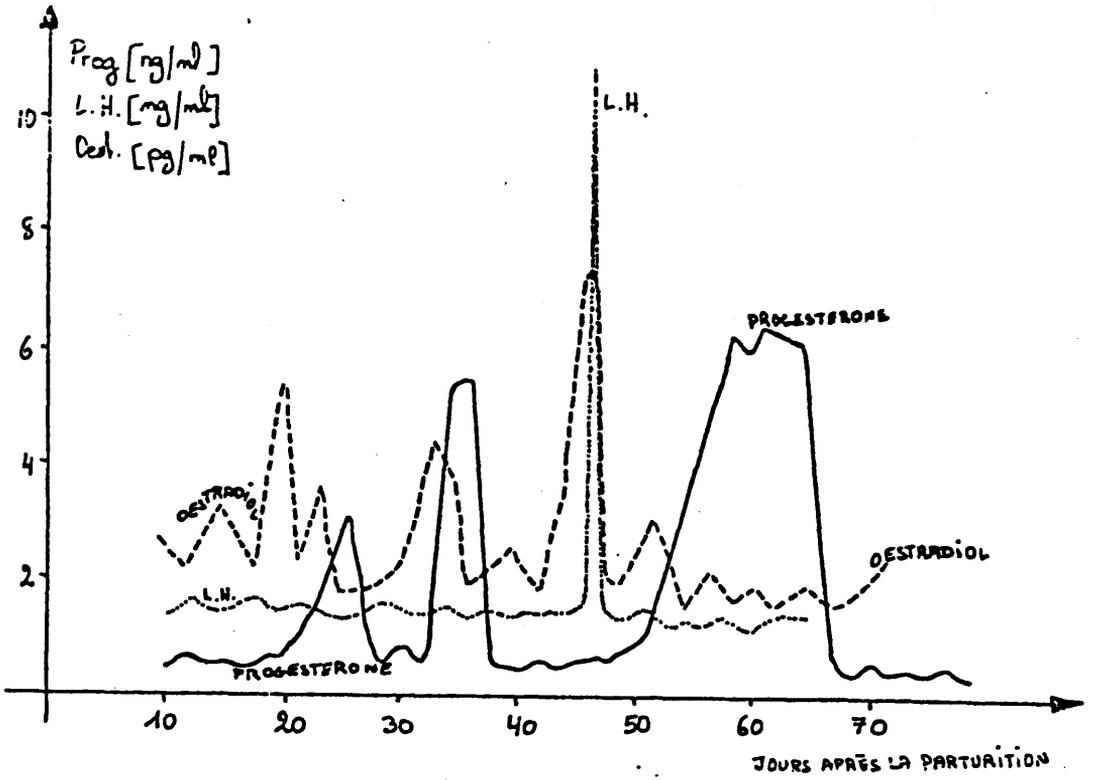


SCHÉMA N° 4

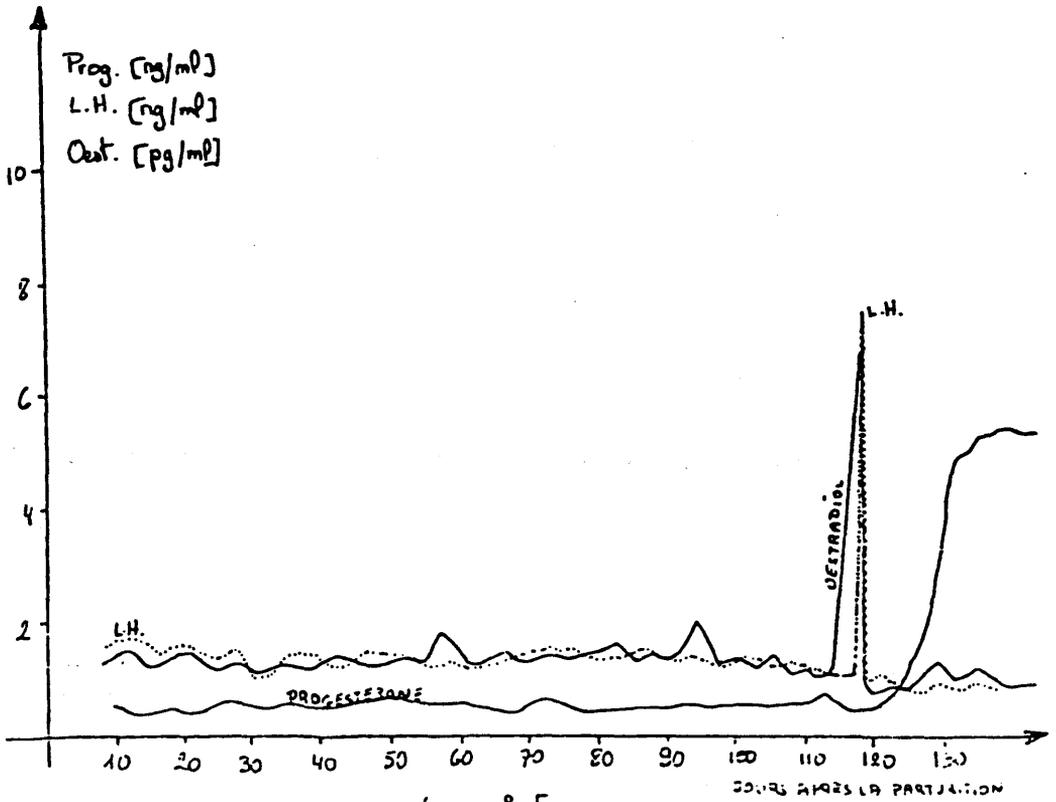


SCHÉMA N° 5

2. LE 17 -B OESTRADIOL

2.1. DOSAGE

La mise au point de ce dosage s'est révélée plus complexe et plus délicate d'une part, suite à l'existence de plusieurs types d'oestrogènes de structure chimique voisine (17- β) Oestradiol, Oestron, Oestriol ...), et d'autre part suite à un niveau plasmatique très bas.

Le dosage exige l'obtention d'anticorps très spécifiques (tableau n° 6 p. 9) et très sensibles, l'utilisation de 2,4,6,7 (n)³H Oestradiol 17-B d'une activité spécifique voisine de 110 Curies/m mole permet d'obtenir une sensibilité de 1 à 2 pg par tube.

Les variations du 17- β Oestradiol au cours du cycle peuvent se résumer de la manière suivante :

- le pic oestral qui atteint un niveau de 8 à 10 pg/ml et s'étale sur une période de 2 à 3 jours,
- le taux de base se situe aux environs de 2 pg/ml,
- des pics accessoires moins élevés et de plus courte durée que le pic oestral (schéma n° 7, page 9).

En effet, durant la phase progestéronique, on observe la présence de plusieurs pics accessoires se reproduisant de manière assez régulière. Ces pics de courte durée et de faible intensité (5-6 pg) signent une activité ovarienne continue ainsi que l'ont démontré différents travaux histologiques (RAJAKOSKI E. 1960 et MARIANA J.C. 1973).

2.2. APPLICATIONS

2.2.1. L'ANOESTRUS

Lors de l'anoestrus observé chez les génisses en hiver, les dosages du 17 -E oestradiol mettent en évidence un silence ovarien total. (Tableau n° 4, page 6 et schéma n° 8, page 10).

TABLEAU N° 6.- SPECIFICITE ANTI-17 β -OESTRADIOL N° 51

Oestrone	0,75	%
Oestriol	0,18	%
17 β -oestradiol	0,35	%
Testostérone	0,0017	%
Progestérone	< 0,001	%
Cortisone	< 0,001	%
Cortisol	< 0,001	%
Aldostérone	< 0,001	%
Cholestérol	< 0,001	%

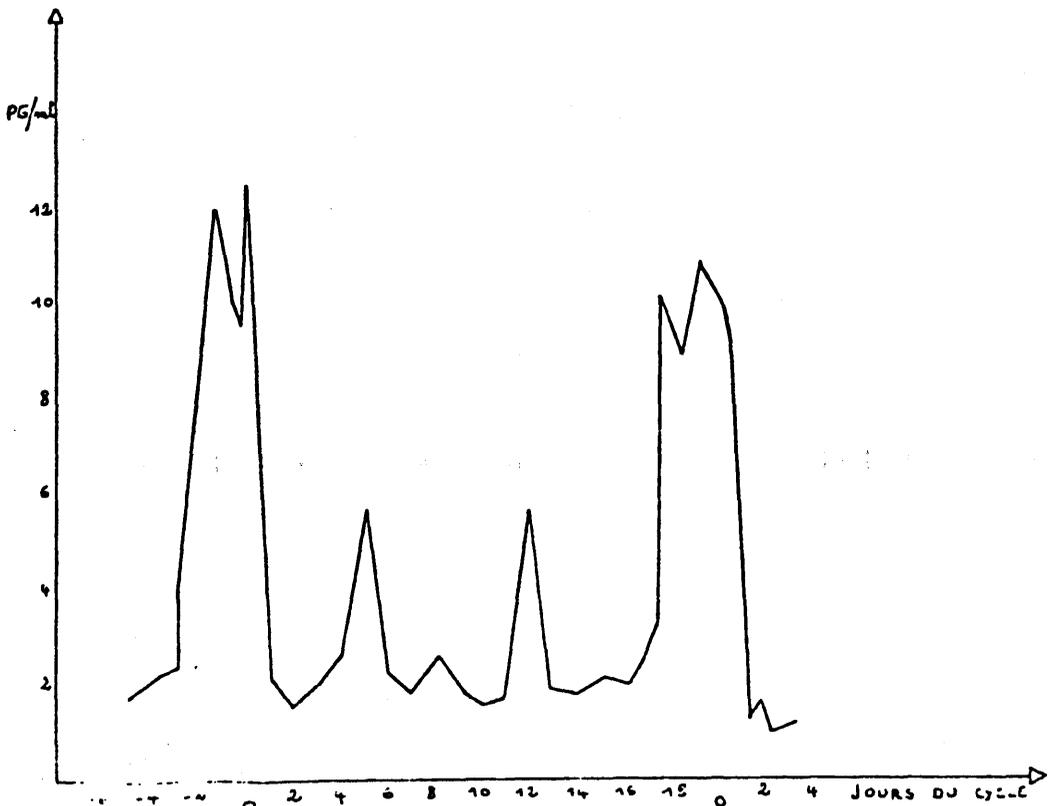


SCHÉMA N° 7

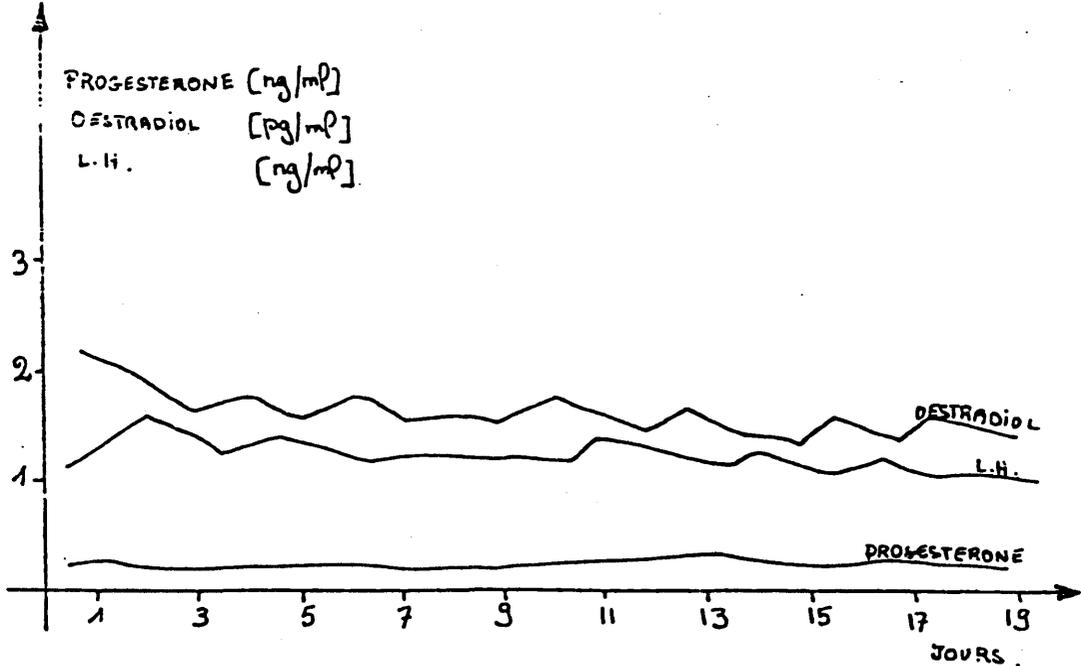


SCHÉMA N° 8

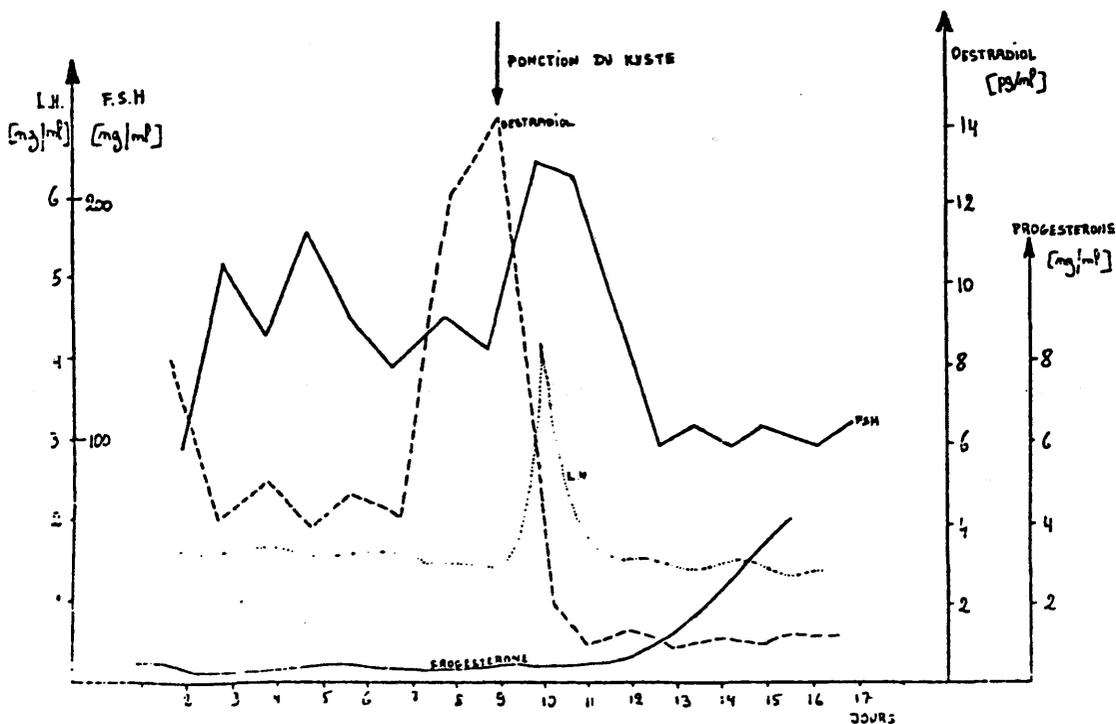


SCHÉMA N° 9

2.2.2. LA NYMPHOMANIE

La nymphomanie est un syndrome neuro-endocrinien qui se traduit sur le plan clinique par une prolongation de l'oestrus au delà des limites de temps normal jusqu'à même en devenir permanent. Chez les vaches atteintes de nymphomanie, le taux du 17- β oestradiol est élevé (15 à 20 pg/ml) pendant plusieurs jours consécutifs. La ponction du kyste est suivie d'une chute rapide du taux des oestrogènes provoquant à son tour une décharge de la L.H. et de la F.S.H. Dans un certain nombre de cas, ce traitement suffit à assurer la lutéinisation du kyste (schéma n° 9, page 10).

3. L.H.

La mise au point du dosage radioimmunologique de la L.H. repose sur la purification de l'hormone, l'obtention d'antisérums spécifiques et sensibles et le marquage de la molécule. Sa mise au point date de plusieurs années (D. SCHAMS et H. KARG 1969). La séparation des fractions libre et liée peut être facilitée par le couplage du sérum antigamma globulines à un support insoluble (système DASP).

Les variations de la L.H. au cours du cycle peuvent se résumer comme suit :

- le pic préovulatoire (15 à 40 nanogrammes/ml), de très courte durée (6 à 8 heures),
- un taux de base variant entre 0,5 et 1,5 ng/ml durant tout le cycle (schéma n° 10, page 12).

4. F.S.H.

Jusqu'à ce jour, la F.S.H. bovine est dosée dans des systèmes hétérologues. Si ces techniques ont permis d'étudier les variations de la F.S.H. au cours du cycle, elles ne sont pas suffisamment sensibles ni reproductibles.

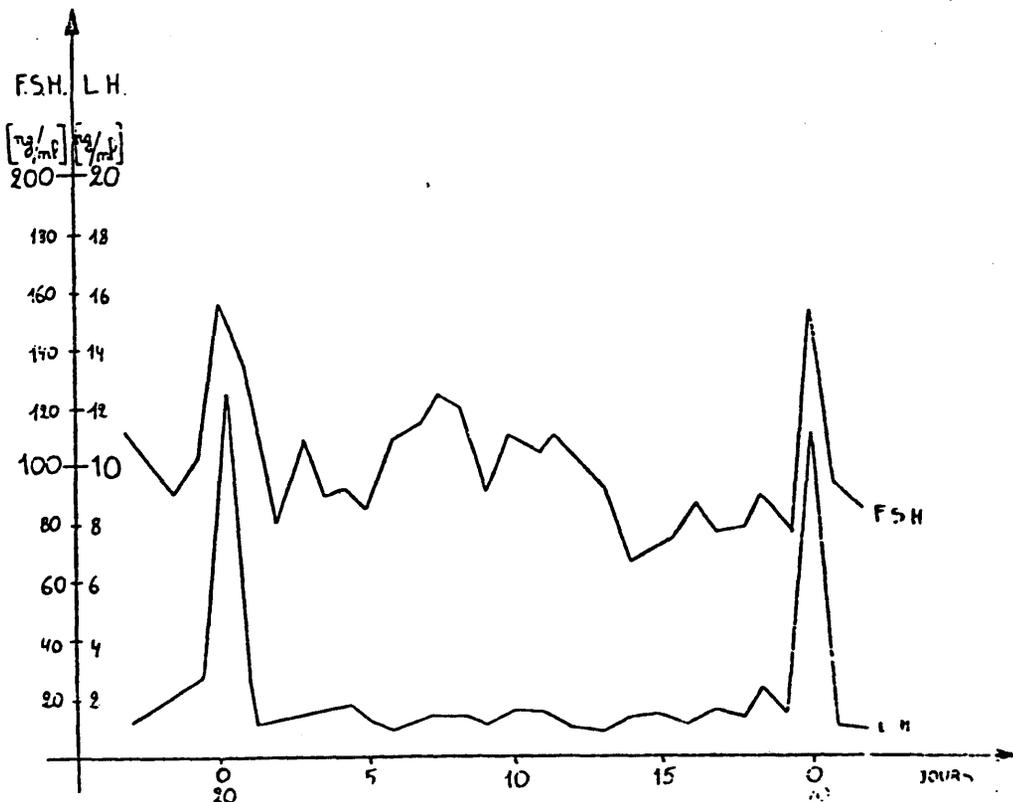


SCHÉMA N° 10

Pour tenter la mise au point d'un dosage homologue nous avons purifié de la F.S.H. bovine qui s'est avérée 60 fois plus active que la b F.S.H. BI du NIH dans le dosage biologique de STEELMAN-POHLEY. Nous essayons actuellement d'obtenir des antisérums spécifiques.

APPLICATIONS

A ce jour les dosages systématiques des gonadotropines L.H. et F.S.H. dans divers cas cliniques n'ont pas permis de mettre en évidence des cas bien marqués d'hypo ou d'hyper fonctionnement hypophysaire. Il est probable que les expériences de stimulation (test au MRH) permettront d'apporter des renseignements complémentaires.

5. RESUME

Les variations du taux plasmatique de la progestérone, du 17β oestradiol, de la L.H. et de la F.S.H. sont étudiées au cours du cycle oestral de la vache, dans le cadre du diagnostic précoce de gestation ainsi que dans des cas précis de stérilité; la nymphomanie et l'anoestrus.

6. BIBLIOGRAPHIE

- HOFFMANN B., HAMBURGER R. et HOLLWICH W. Bestimmung von Progesterone direkt in Milchfett als verbessertes Verfahren zur Fertilitätskontrolle bei der Kuh. Zuchthyg., 12, 1-7 (1977).