

Année 2021

LE DOSAGE DE LA PROGESTÉRONE CHEZ LA CHIENNE : INDICATIONS, MÉTHODES ET COMPARAISON DES TECHNIQUES

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)
le 10 novembre 2021

par

Gabrielle, Lou, Hélène FERRON

née le 4 août 1997 à Paris 10^{ème} (Paris)

sous la direction de

Alain Fontbonne

JURY

Président du jury :	M. Sylvain Bellier	Professeur à l'EnvA
Directeur de thèse :	M. Alain Fontbonne	Professeur à l'EnvA
Examineur :	M. Pierre Deshuillers	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des personnes intervenant dans l'enseignement



Directeur : Pr Christophe Degueurce
Directeur des formations : Pr Henry Chateau
Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Professeurs émérites : Pr Pascal Fayolle, Pr Bernard Paragon
Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Elevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC) Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

<p>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs - Pr Verwaerde Patrick</p> <p>Discipline : cardiologie - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier contractuel</p> <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie - Dr Pignon Charly, Ingénieur de recherche - Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : dermatologie - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : ophtalmologie - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de clinique équine - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Coudry Virginie, Praticienne hospitalier contractuelle - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Mespouhès-Rivière Céline, Ingénieure de recherche-Praticienne hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tallaj Amélie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel</p>	<p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale - Dr Benchezkroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guilbert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences - Dr Mortier Jérémy, Maître de conférences associé</p> <p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Fontbonne Alain - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Nudelmman Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Manassero Mathieu - Dr Maurice Emeline, Assistante d'Enseignement et de Recherche Contractuelle - Pr Viateau-Duval Véronique*</p>
---	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP) Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments - Dr Bolnot François, Maître de conférences* - Pr Carlier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mtimet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Dr Guétin Poirier Valentine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier contractuel - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences</p>	<p>Unité pédagogique de reproduction animale - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences* - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew</p> <p>Rattachée DPASP - Dr Wolgust Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle</p>
---	---

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP) Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - Adjoint : Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline*</p> <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Jouvion Grégory, Professeur associé - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marignac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée</p>	<p>Unité de parasitologie, mycologie - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Pr Guillot Jacques - Dr Polack Bruno, Maître de conférences* - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud</p> <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tirez Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Rattachée DSBP - Mme Dalaine Stéphanie, Professeur agrégée (Sciences de la Vie et de la Terre)</p> <p>* responsable d'unité pédagogique</p>
---	--

Remerciements

Au Professeur Sylvain Bellier, Professeur à l'EnVA,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse et pour votre extrême disponibilité pour les dernières corrections.

À mon directeur de thèse, Professeur Alain Fontbonne, professeur à l'EnVA,

pour m'avoir soutenue dans la rédaction de travail avec bienveillance et pour tous vos précieux conseils.

À M. Pierre Deshuillers, Maître de conférences à l'EnVA,

pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de cette thèse.

À ma famille et mes amis qui m'ont accompagnée sur ce chemin.

Table des matières

Liste des figures.....	7
Liste des abréviations.....	9
Introduction	11
1 Les applications du dosage de la progestérone chez la chienne	13
1.1 Description et endocrinologie du cycle sexuel de la chienne.....	13
1.1.1 Généralités	13
1.1.1.1 Saisonnalité	13
1.1.1.2 La puberté.....	13
1.1.2 Cycle œstral de la chienne.....	13
1.1.2.1 Le proœstrus	14
1.1.2.2 L'œstrus.....	14
1.1.2.3 Le dicœstrus.....	14
1.1.2.4 L'anœstrus.....	15
1.1.3 Cycle ovarien.....	16
1.1.3.1 Définition.....	16
1.1.3.2 Phase folliculaire.....	17
1.1.3.3 Ovulation.....	18
1.1.3.4 Phase lutéale	19
1.1.4 Endocrinologie du cycle	20
1.1.4.1 Description des hormones impliquées dans le cycle sexuel de la chienne	20
1.1.4.1.1 Une hormone hypothalamique : la gonadolibérine (GnRH)	20
1.1.4.1.2 Les gonadotropines : Hormone Lutéinisante (LH) et Hormone Folliculo-Stimulante (FSH)	21
1.1.4.1.3 Les œstrogènes (E2).....	21
1.1.4.1.4 La progestérone (P4)	22
1.1.4.1.5 La relaxine	22
1.1.4.1.6 La prolactine	22
1.1.4.2 Contrôle hormonal du cycle sexuel de la chienne	22
1.1.4.2.1 Contrôle hormonal au cours du proœstrus.....	23
1.1.4.2.2 Contrôle hormonal au cours de l'œstrus	24
1.1.4.2.3 Contrôle hormonal au cours du dicœstrus	25
1.1.4.2.4 Contrôle hormonal au cours de l'anœstrus	26
1.2 Métabolisme et rôle de la progestérone chez la chienne.....	26
1.2.1 Description	26
1.2.2 Transport.....	27
1.2.3 Mécanisme d'action.....	28
1.2.4 Catabolisme	29
1.2.5 Rôle de la progestérone	29
1.2.5.1 Ovulation.....	29
1.2.5.2 Contrôle de l'implantation et de la nidation.....	30
1.2.5.3 Contrôle de la gestation.....	31
1.2.5.4 Contrôle du développement mammaire et de la lactation	31
1.2.5.5 Autres fonctions générales de la progestérone	31
1.3 Applications du dosage de la progestérone.....	32
1.3.1 Applications du dosage de la progestérone dans un cycle normal	32
1.3.1.1 Méthode et réalisation d'un suivi de chaleurs.....	32
1.3.1.1.1 Méthode de référence : dosage de la progestérone couplé au frottis vaginal... 32	
1.3.1.1.2 Une méthode plus compliquée en pratique : l'échographie	35
1.3.1.2 Méthode de détermination de la date d'ovulation et délai de fertilité de la chienne 35	
1.3.1.2.1 Dosage de progestérone et date d'ovulation.....	35
1.3.1.2.2 Détermination du délai de fertilité.....	36
1.3.1.3 Méthode de détermination de la durée de gestation	36

1.3.1.3.1	Estimation de la durée de gestation par rapport à la saillie ou l'insémination...	36
1.3.1.3.2	Calcul de la durée de gestation grâce au dosage de progestérone lors de la lutéinisation pré-ovulatoire.....	37
1.3.1.3.3	Calcul de la durée de gestation de la chienne à l'aide du dosage de la progestérone lors de l'ovulation.....	37
1.3.1.4	Méthode de détermination de la date de parturition et de césarienne.....	38
1.3.1.4.1	Détermination de la date de parturition par le dosage de la progestérone	38
1.3.1.4.2	Césarienne et dosage de progestérone	38
1.3.1.5	Dosage de la progestérone chez une chienne normalement cyclée présentant des problèmes de fertilité.....	39
1.3.1.5.1	Infertilité lors de suspicion d'insuffisance lutéale.....	40
1.3.1.5.1.1	La progestéronémie au cours de la gestation	40
1.3.1.5.1.2	Définition de l'insuffisance lutéale et étiogénie	40
1.3.1.5.1.3	Diagnostic d'une insuffisance lutéale et prise en charge médicale.....	41
1.3.1.5.2	Augmentation retardée de la progestéronémie	41
1.3.1.5.2.1	La progestéronémie avant le pic de LH : rappels	41
1.3.1.5.2.2	Définition de l'augmentation lente de la progestéronémie et étiogénie	41
1.3.1.5.2.3	Diagnostic biologique d'une augmentation lente de progestéronémie et prise en charge.....	42
1.3.2	Applications du dosage de la progestérone dans un cycle anormal	42
1.3.2.1	Application du dosage de la progestérone chez une chienne présentant une durée d'interœstrus courte	42
1.3.2.1.1	Interœstrus court suivi d'une ovulation après les chaleurs chez la chienne	43
1.3.2.1.2	Interœstrus court sans ovulation après les chaleurs chez la chienne	44
1.3.2.2	Interœstrus court dans le cas des chaleurs disjointes ou « fausses chaleurs ».....	44
1.3.2.3	Application du dosage de la progestérone chez une chienne présentant une durée d'interœstrus longue (supérieure à 10 mois)	44
1.3.2.3.1	Dosage de la progestérone dans le cas d'un anœstrus prolongé.....	44
1.3.2.3.1.1	Différentiation entre anœstrus vrai et chaleurs silencieuses	44
1.3.2.3.1.2	Dosage de progestérone dans le cas de chaleurs silencieuses	46
1.3.2.3.1.3	Dosage de progestérone dans le cas d'anœstrus vrai	46
1.3.2.3.2	Dosage de la progestérone dans le cas d'un diœstrus prolongé.....	46
2	Les différentes techniques pour doser la progestérone	47
2.1	Techniques d'analyses immunologiques quantitatives	47
2.1.1	Le dosage radio-immunologique ou RIA	47
2.1.1.1	Principe.....	48
2.1.1.1.1	Constituants et compétition (Patrono et Peskar, 1987 ; Hannon <i>et al.</i> , 2004) ..	48
2.1.1.1.2	Séparation	49
2.1.1.1.3	Détermination de la concentration.....	49
2.1.1.2	Avantages.....	50
2.1.1.2.1	Sensibilité	50
2.1.1.2.2	Spécificité	50
2.1.1.3	Inconvénients.....	50
2.1.1.3.1	Durée de vie courte du RIA.....	50
2.1.1.3.2	Règlementation de la radioactivité	51
2.1.1.3.3	Gestion du stockage et des déchets	51
2.1.1.3.4	Interférences	51
2.1.2	Les dosages immuno-enzymatiques ou EIA	51
2.1.2.1	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée : ELISA	52
2.1.2.1.1	ELISA direct	52
2.1.2.1.1.1	Description	52
2.1.2.1.1.2	Particularités	53
2.1.2.1.2	ELISA indirect.....	53
2.1.2.1.2.1	Description	53
2.1.2.1.2.2	Particularités	54
2.1.2.1.3	ELISA sandwich	54
2.1.2.1.3.1	Description	54
2.1.2.1.3.2	Particularités	55
2.1.2.1.4	ELISA par compétition : dosage de choix pour la progestérone	55

2.1.2.1.4.1	Principe	55
2.1.2.1.4.2	Particularités	55
2.1.2.2	Immunodosages enzymatiques par fluorescence (FEIA et ELFA)	55
2.1.2.2.1	Principe de fluorescence	56
2.1.2.2.2	Principe des dosages FEIA ou ELFA	56
2.1.2.2.3	Particularités	57
2.1.2.3	Avantages	57
2.1.2.3.1	Avantages des dosages par colorimétrie	57
2.1.2.3.2	Avantages des dosages par fluorescence	57
2.1.2.4	Inconvénients	58
2.1.2.4.1	Limites de spécificité liées aux propriétés enzymatiques	58
2.1.2.4.2	Limites des dosages enzymatiques liées à des problèmes de détection	58
2.1.2.4.2.1	Limites des dosages par colorimétrie	58
2.1.2.4.2.2	Limites des dosages par fluorescence	58
2.1.3	Dosage immunologique par chimiluminescence ou CLIA	59
2.1.3.1	Principe de chimiluminescence	59
2.1.3.1.1	Principe de la technique CLIA	59
2.1.3.1.2	Particularités	59
2.1.3.2	Avantages des dosages par chimiluminescence	60
2.1.3.3	Limites des dosages par chimiluminescence	60
2.2	Techniques immunologiques semi-quantitatives	60
2.2.1	Principe	60
2.2.1.1	Principe d'ELISA par compétition	60
2.2.1.2	Témoins de concentration : une nécessité	61
2.2.2	Avantages	62
2.2.3	Inconvénients	62
2.3	Dosage quantitatif par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	62
2.3.1	Principe de la LC-MS	62
2.3.1.1	Principe de la chromatographie en phase liquide	62
2.3.1.2	Principe de la spectrométrie de masse	63
2.3.1.3	Principe du dosage LC-MS	64
2.3.2	Avantages de la LC-MS	64
2.3.3	Inconvénients de la LC-MS	64
2.3.3.1	Lié à l'échantillon	64
2.3.3.2	Lié à la technicité du dosage	65
2.4	Dosages quantitatifs par fluorescence améliorée	65
2.4.1	Fluorescence améliorée de plasmons de surface (SPFS)	65
2.4.2	Fluorescence induite par laser (LIF)	66
2.4.3	Avantages	66
2.4.3.1	Avantages du dosage SPFS	66
2.4.3.2	Avantages du dosage par la LIF	67
2.4.4	Inconvénients	67
2.4.4.1	Inconvénients du dosage SPFS	67
2.4.4.2	Inconvénients du dosage LIF	67
3	Comparaison des différentes techniques de dosage de la progestérone chez la chienne	69
3.1	Comparaison des possibilités à disposition des vétérinaires pour le dosage de la progestérone chez la chienne	69
3.1.1	Dosage externe ponctuel de la progestérone en laboratoire de référence	69
3.1.1.1	Envoi de prélèvements aux laboratoires vétérinaires de référence	69
3.1.1.2	Avantages des dosages en laboratoire de référence	70
3.1.1.3	Limites des dosages en laboratoire de référence	70
3.1.1.3.1	Coût pour le propriétaire	70
3.1.1.3.2	Délai d'obtention	70
3.1.1.3.3	Lié à la gestion du prélèvement pour le vétérinaire	71

3.1.2	Dosages <i>in situ</i> de la progestérone.....	71
3.1.2.1	Une multitude de dosages réalisables en clinique.....	71
3.1.2.2	Avantages des dosages <i>in situ</i>	71
3.1.2.3	Limites des dosages <i>in situ</i>	72
3.2	Comparaison de la performance de dosage des différentes techniques et analyseurs de la progestérone chez la chienne	72
3.2.1	Méthode de comparaison de la performance d'un analyseur	72
3.2.1.1	Paramètres de comparaison statistique	72
3.2.1.1.1	Évaluation des relations entre deux séries de variables quantitatives	72
3.2.1.1.2	Évaluation de la précision d'une méthode.....	73
3.2.1.1.3	Qualités intrinsèques d'une méthode	74
3.2.1.2	Technique de référence du dosage vétérinaire de la progestérone	74
3.2.1.2.1	Dosage radio-immunologique : un gold-standard dépassé ?.....	74
3.2.1.2.2	Dosage LC-MS : une nouvelle technique de référence.....	74
3.2.2	Étude de la performance des automates CLIA pour le dosage de la progestérone.....	75
3.2.2.1	Présentation des systèmes de dosage CLIA accessibles en France	75
3.2.2.1.1	Systèmes Immulite® (Siemens Healthcare Diagnostics, Californie).....	75
3.2.2.1.2	Système Access 2 (Beckman Coulter, Californie, USA)	76
3.2.2.1.3	Système Elecsys® (Roche Diagnostics, Allemagne).....	77
3.2.2.2	Performance de l'Immulite	78
3.2.2.2.1	Performance du test Immulite 1000 initial sur sérum	78
3.2.2.2.2	Performance du test Immulite 1000 modifié sur sérum.....	79
3.2.2.2.3	Performance du test Immulite 2000 sur sérum et plasma.....	80
3.2.2.2.4	Performances comparées de l'Immulite 1000 et 2000 sur sérum	81
3.2.2.3	Performance de l'Access 2	81
3.2.2.4	Performance de l'Elecsys sur sérum	81
3.2.3	Étude de la performance des automates ELFA et FEIA pour le dosage de la progestérone	82
3.2.3.1	Description des automates accessibles en France	82
3.2.3.1.1	Système ELFA sur sérum et plasma : Mini Vidas® (Biomérieux, France).....	82
3.2.3.1.2	Système FEIA sur sérum : AIA360 (TOSOH Bioscience, Japon)	83
3.2.3.1.3	Système ELFA sur sérum : Vcheck® ou Kimmuno1® (Kitvia).....	84
3.2.3.2	Performance du Mini Vidas.....	84
3.2.3.3	Performance du AIA360	84
3.2.4	Étude de la performance des automates par fluorescence améliorée pour le dosage de la progestérone	85
3.2.4.1	Description des systèmes mis sur le marché	85
3.2.4.1.1	Système SPFS sur sérum et plasma : DRI-CHEM AU10V (Fujifilm Holdings Corporation, Japon).....	85
3.2.4.1.2	Système LIF sur sérum et plasma, Speed Progesterone (Virbac, France).....	86
3.2.4.2	Performance du DRI-CHEM AU10V®	87
3.2.4.3	Performance du Speed Progesterone®.....	88
3.2.5	Étude de la performance des techniques ELISA pour le dosage de la progestérone.....	89
3.2.5.1	Description des techniques.....	89
3.2.5.1.1	Dosages Ovucheck® (Biovét Inc, Canada).....	89
3.2.5.1.1.1	Dosage quantitatif sur sérum et plasma : Ovucheck Plasma®.....	89
3.2.5.1.1.2	Dosage semi-quantitatif sur sérum et plasma : Ovucheck Premate®	90
3.2.5.1.2	Dosage semi-quantitatif sur sérum et plasma : Ovulation Test® (Virbac BVT, France)	90
3.2.5.1.3	Dosage quantitatif sur sérum et plasma : Catalyst Progesterone® (Idexx Laboratories, États-Unis).....	90
3.2.5.2	Performance des techniques ELISA quantitatives.....	91
3.2.5.2.1	Performance de l'Ovucheck Plasma®.....	91
3.2.5.2.2	Performance du Catalyst Progesterone	91
3.2.5.3	Performance des techniques semi-quantitatives	92
3.2.5.3.1	Performance de l'Ovucheck Premate®	92
3.2.5.3.1.1	Performance de l'Ovucheck Premate® seul	92
3.2.5.3.1.1.1	Performance du dosage Premate® pour l'appréciation de la date optimale de fertilité	92

3.2.5.3.1.1.2	Performance du dosage Premate® pour l'appréciation de la date de parturition chez la chienne	92
3.2.5.3.1.2	Performance de l'Ovucheck Premate® associé à l'Ovucheck Reader® ...	93
3.2.5.3.2	Performance de l'Ovulation Test®	93
3.2.5.3.2.1.1	Performance de l'Ovulation Test® pour l'appréciation de la date de fertilité optimale	93
3.2.5.3.2.1.2	Performance de l'Ovulation Test® pour l'appréciation de la date de parturition chez la chienne	94
3.2.6	Limites d'interprétation des valeurs des automates en pratique	94
3.2.6.1	Limite d'interprétation des valeurs chiffrées selon les machines	94
3.2.6.2	Limite d'interprétation des valeurs selon le type d'échantillon	95
3.2.6.3	Limite d'interprétation selon l'état et la conservation de l'échantillon	95
3.2.6.4	Limite d'interprétation des valeurs selon l'heure de la prise de sang	96
3.3	Comparaisons des critères généraux des différents automates pour doser la progestérone <i>in situ</i>	96
3.3.1	Description des caractéristiques spécifiques du Mini-Vidas	96
3.3.1.1	Caractéristiques techniques du Mini-Vidas	96
3.3.1.2	Utilisation du Mini-Vidas	97
3.3.2	Description des caractéristiques spécifiques de l'AIA 360®	97
3.3.2.1	Caractéristiques techniques de l'AIA 360®	97
3.3.2.2	Utilisation de l'AIA 360®	98
3.3.3	Description des caractéristiques spécifiques du VCheck® ou Kimmuno1®	98
3.3.3.1	Caractéristiques du VCheck®	98
3.3.3.2	Utilisation du VCheck®	98
3.3.4	Description des caractéristiques spécifiques du DRI-CHEM AU10V®	99
3.3.4.1	Caractéristiques du DRI-CHEM AU10V®	99
3.3.4.2	Utilisation de l'AU10V	99
3.3.5	Description des caractéristiques spécifiques du Speed Reader®	99
3.3.5.1	Caractéristiques du Speed Reader®	99
3.3.5.2	Utilisation du Speed Reader®	100
3.3.6	Description des caractéristiques spécifiques du Catalyst Progesterone®	100
3.3.6.1	Caractéristiques du Catalyst®	100
3.3.6.2	Utilisation du Catalyst Progesterone®	100
3.3.7	Description des caractéristiques de l'Ovucheck Plasma	101
3.3.7.1	Caractéristiques de l'Ovucheck Plasma®	101
3.3.7.2	Utilisation de l'Ovucheck Plasma®	101
3.3.8	Description des caractéristiques des tests semi-quantitatifs	101
3.3.8.1	Caractéristiques de l'Ovucheck Premate® et de l'Ovulation Test®	101
3.3.8.2	Utilisation des tests semi-quantitatifs	101
	Conclusion	103
	Liste des références bibliographiques	105

Liste des figures

Figure 1 : Evolution cellulaire du frottis vaginal au cours du cycle sexuel de la chienne (Feldman et Nelson, 2004a).....	15
Figure 2 : Evènements ovariens en fonction du cycle de la chienne (Constant, 2019)	16
Figure 3 : Schéma d'un ovaire et des différents stades du cycle ovarien (Klein et Mayer, 1963)	17
Figure 4 : Structure histologique d'un follicule ovarien mur, modifié par Cordonnier N. (UC78) 2019, d'après Ross and Pawlina (Histology, a text and atlas. 6th edition)	18
Figure 5 : Evolution terminale de la phase folliculaire et ovulation sous contrôle endocrinien (Chastant-Maillard, 2011)	19
Figure 6 : Lien entre concentration sérique entre GnRH et LH au moment de l'ovulation (Tiret, 2017b).....	21
Figure 7 : Concentrations moyennes sériques (sur 8 femelles Beagle) d'œstradiol, de progestérone, de LH et FSH pendant le proœstrus et l'œstrus, (Concannon, 2009)	24
Figure 8 : Résumé des différentes évolutions hormonales au cours du cycle de la chienne (Kowaleski, 2018)	25
Figure 9 : Biosynthèse des hormones stéroïdogènes ovariennes à partir de la progestérone chez l'humain, (Bulun, 2016).....	27
Figure 10 : Mode d'action et récepteurs de la progestérone, (Bulun 2016)	29
Figure 11 : Régulation hormonale de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien, (Roos et Fontbonne 2017).....	30
Figure 12 : Evolution du pourcentage en cellules kératinisées en fonction de la progestéronémie pour les frottis vaginaux étudiés, (Luc, 2005)	33
Figure 13 : Critères cytologiques et valeurs seuil de progestéronémie, (Luc, 2005)	33
Figure 14 : Utilisation combinée des frottis vaginaux et des dosages de progestérone lors d'un suivi de chaleurs chez une chienne, (Fontbonne, 1992)	34
Figure 15 : Evolution de la progestérone dans un cycle normal et un cycle avec durée d'interœstrus courte, (England, 2010).....	43
Figure 16 : Arbre décisionnel lors d'ancœstrus apparent d'une chienne (modifié, d'après Lévy, 2011)	45
Figure 17 : Principe simplifié du dosage radio-immunologique, (http://www.biosciencenotes.com/radioimmunoassay-ria/ , 2018)	48
Figure 18 : Exemple de réalisation de courbes standard en RIA (Midgley et al., 1969)	49
Figure 19 : Mécanisme de l'ELISA direct, (modifié d'après Parker et al 2016)	53
Figure 20 : Principes des dosages ELISA indirect et par sandwich (Salazar et al., 2017)	54
Figure 21 : Schéma simplifié du phénomène de fluorescence, (d'après Neuburger, 2006)	56
Figure 22 : Principe du test ELISA par compétition, (Béné et al. 2014).....	61
Figure 23 : Lecture de l'intervalle du taux de progestérone sérique par test semi-quantitatif, (Biovet Inc., 2016)	61

Figure 24 : Spectre 3D de LC-MS (chromatogramme combiné avec le spectre de masse, d'après Wikipedia, image libre de droit « Liquid_chromatography_MS_spectrum_3D_analysis »).....	63
Figure 25 : Principe simplifié de la méthode SPFS, (Li et al., 2017)	66
Figure 26 : Analyseur Immulite 1000, (Siemens Healthineers, 2021)	75
Figure 27 : Analyseur Immulite 2000, (Siemens Healthcare Diagnostics, 2013)	76
Figure 28 : Automate CLIA Access 2®, (Beckman Coulter Inc., 2021).....	76
Figure 29 : Analyseur Cobas 6000, (Roche Diagnostics, 2016)	77
Figure 30 : Régression de Passing-Bablok représentant 48 mesures de progestérone par l'Immulite 2000 en fonction de celles dosées par RIA, (Tal et al. 2020)	80
Figure 31 : Mécanisme du dosage ELFA Vidas®, (Biomérieux, 2018)	82
Figure 32 : Automate mini Vidas®, (Biomérieux, 2018)	83
Figure 33 : Automate AIA360®, (Tosoh Bioscience Inc., 2021).....	83
Figure 34 : Automate FUJI DRI CHEM Immuno AU-10V (Fujifilm, 2018)	86
Figure 35 : Automate Speed Reader®, (Virbac BVT, 2017)	87
Figure 36 : Courbe de corrélation linéaire de comparaison entre le Speed Progesterone (Virbac) et une méthode CLIA de référence inconnue, (n=165), (BVT Virbac, 2017).....	88
Figure 37 : Le spectrophotomètre de poche Ovuchek Reader (Kitvia, 2021)	89

Liste des abréviations

Ac : Anticorps
ACTH : hormone adrénocorticotrope ou adrénocorticotrophine
Ag : Antigène
ASN : Autorité de Sûreté Nucléaire
CBG : *Corticoid Binding Globulin*
CPM : comptage par minute
CERCA : Centre d'Étude en Reproduction des Carnivores de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort
cPL : lipase pancréatique canine
CRP : protéine C-réactive
CV : coefficient de variation
ELFA : *Enzyme-Linked Fluorescent Assay*
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ET : écart-type
FEIA : *Fluorescent Enzyme Immunoassay*
fPL : lipase pancréatique féline
FSH : *Follicule Stimulating Hormone*
GH : *Growth Hormone*
GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone*
IgE : Immunoglobuline E
LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LH : *Luteinizing Hormone*
LIF : Fluorescence Induite par Laser
ml : millilitre
mm : millimètre
mol : mole
ng : nanogramme
nm : nanomole
NT-proBNP : portion N-terminale du peptide cérébral natriurétique
P4 : Progestérone
pg : picogramme
PGF2 alpha : Prostaglandines 2 alpha
QR code : *quick-response code*
RIA : *Radioimmuno assay* ou dosage radio-immunologique
RLU : Unités de Lumière Relatives
S1 : singulet d'émission de photon
SAA : sérum amyloïde A
SDMA : dyméthylarginine symétrique
SPFS : *Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy*
T3 : triiodotironine
T4 : thyroxine

Introduction

Depuis une vingtaine d'années un nouveau type de clientèle exigeante émerge au sein des cliniques vétérinaires : les éleveurs canins. Auparavant la majorité d'entre eux ne faisaient appel aux vétérinaires que pour des urgences gynécologiques ou pédiatriques. Désormais, le paysage de l'élevage canin a changé. Il s'agit désormais d'accoupler des reproducteurs renommés et il ne suffit plus de mettre au contact un mâle et une femelle. La tendance est à l'import de semence ou au déplacement d'une femelle à la saillie dans un autre pays. De plus, on observe une multiplication concomitante de gestations à risques avec un nombre toujours plus important de races brachycéphales. La profession de l'élevage se spécialise impliquant des surcoûts d'insémination et donc un manque à gagner dès lors qu'un problème de fertilité apparaît.

Toutes ces transformations du paysage de la reproduction canine nécessitent une adaptation des vétérinaires pour la mise en place de suivis personnalisés et rigoureux des femelles, que ce soit lors de césarienne programmée, de suivi de chaleurs ou d'infertilité. Le dosage de la progestérone est devenu un outil indispensable en clinique pour le vétérinaire. En effet, son rôle dans le cycle sexuel de la chienne en a fait un paramètre incontournable de la maîtrise de la reproduction. Il y a quelques années une nouvelle loi a eu des implications radicales dans le domaine de la médecine vétérinaire : l'ordonnance de réforme de la biologie médicale, ratifiée par la loi du 30 mai 2013, a scindé les laboratoires de biologie médicale et vétérinaire. Les échantillons sanguins ne peuvent plus être envoyés dans des laboratoires de biologie médicale humaine et doivent désormais être acheminés vers des laboratoires vétérinaires spécialisés, augmentant les coûts et les délais de résultats. Cette loi a eu des fortes répercussions dans de nombreux domaines vétérinaires comme la médecine interne ou la reproduction car les dosages hormonaux sont devenus beaucoup moins accessibles.

Cette thèse bibliographique a pour vocation de rassembler dans un premier temps les applications et indications du dosage de la progestérone chez la chienne. Dans un second temps, il s'agit de passer en revue et d'évaluer les différentes techniques de dosage à destination des vétérinaires, puis dans un dernier temps d'examiner les solutions actuelles disponibles sur le marché français en fonction de l'utilisation désirée par les vétérinaires.

1 Les applications du dosage de la progestérone chez la chienne

1.1 Description et endocrinologie du cycle sexuel de la chienne

1.1.1 Généralités

1.1.1.1 Saisonnalité

La chienne est une femelle à reproduction non saisonnée, c'est-à-dire que la survenue des chaleurs est indépendante de la saison et du climat. Elle est de surcroît multipare à cycle mono-œstrien et à ovulation spontanée ce qui implique qu'une seule ovulation de plusieurs follicules a lieu à chaque cycle, sans nécessité d'accouplement (Concannon, 2010).

Cependant, certaines chiennes domestiques, comme les Basenji et les hybrides de loup (Chien de Saarloos, chien-loup Tchèque) possèdent une saisonnalité des chaleurs, avec un œstrus apparaissant à l'automne lorsque la photo-période diminue (Fuller, 1956 ; Concannon *et al.*, 2009).

1.1.1.2 La puberté

La puberté est définie comme l'âge d'apparition des premières chaleurs (Root Kustritz, 2010). La chienne devient pubère en moyenne entre 6 et 10 mois. On considère généralement que les races naines sont plus précoces que les grandes races même si certaines races notamment primitives peuvent faire exception (Johnston *et al.*, 2001).

De nombreuses variations individuelles et des prédispositions raciales peuvent faire osciller la survenue des premières chaleurs de 4 mois jusqu'à 24 mois. Si aucune chaleur n'est observée avant 24 mois, la chienne possède un retard de puberté (Root Kustritz, 2010). L'absence de visualisation de signes de chaleurs devra conduire à une recherche d'un défaut de détection des chaleurs lors de chaleurs silencieuses par exemple, ou bien encore d'ancœstrus vrai (Wilborn et Maxwell, 2012).

1.1.2 Cycle œstral de la chienne

Le cycle sexuel normal de la chienne se divise en quatre étapes : le proœstrus, l'œstrus, le diœstrus ou metœstrus et l'ancœstrus (Fontbonne, 2008).

La durée moyenne d'un cycle œstral canin est variable selon les races et les prédispositions individuelles. L'interœstrus est défini comme la durée séparant deux épisodes de chaleurs. En moyenne il dure 6 mois. Cependant il existe de grandes

variabilités selon les races et les chiennes, avec par exemple un cycle plus court chez le Berger Allemand et plus long chez le Basenji ou le Laïka Russe (Thébault, 2006). La période de chaleurs est définie comme l'association du proœstrus et de l'œstrus.

1.1.2.1 Le proœstrus

Le proœstrus est défini comme la période au cours de laquelle la femelle attire les mâles mais refuse l'accouplement. Il dure en moyenne 9 jours dans un intervalle de 0 à 17 jours (Johnston *et al.*, 2001).

La chienne présente alors dans un premier temps un œdème de la vulve accompagné dans un second temps d'écoulements vulvaires séro-sanguins. On observe au frottis vaginal des hématies et de nombreuses cellules parabasales et intermédiaires. Au fur et à mesure de l'évolution du proœstrus, il y a une augmentation de la proportion de cellules kératinisées superficielles (Johnston *et al.*, 2001 ; Feldman et Nelson, 2004a) comme le montre la figure 1.

1.1.2.2 L'œstrus

L'œstrus est défini comme la période au cours de laquelle la femelle accepte l'accouplement. Il dure en moyenne 9 jours avec des variations entre 4 à 24 jours (Johnston *et al.*, 2001). La vulve garde son aspect gonflé mais les sécrétions vulvaires s'éclaircissent.

Le frottis vaginal montre une absence de polynucléaires neutrophiles et la présence à plus de 80% de cellules superficielles kératinisées (figure 1).

1.1.2.3 Le dioœstrus

Le dioœstrus ou metœstrus est la période qui suit l'œstrus ; elle démarre à partir du moment où la chienne refuse l'accouplement et dure en moyenne 70 à 80 jours que la chienne soit gestante ou non (Johnston *et al.*, 2001 ; Constant *et al.*, 2019).

Il est difficile d'évaluer précisément le début du dioœstrus sans frottis vaginal. Les modifications observées sont une diminution de la taille de la vulve, et une modification progressive des sécrétions vaginales. Un développement du tissu mammaire peut également être observé chez la chienne, même non gestante, imputable aux taux circulants élevés de progestérone (Johnston *et al.*, 2001).

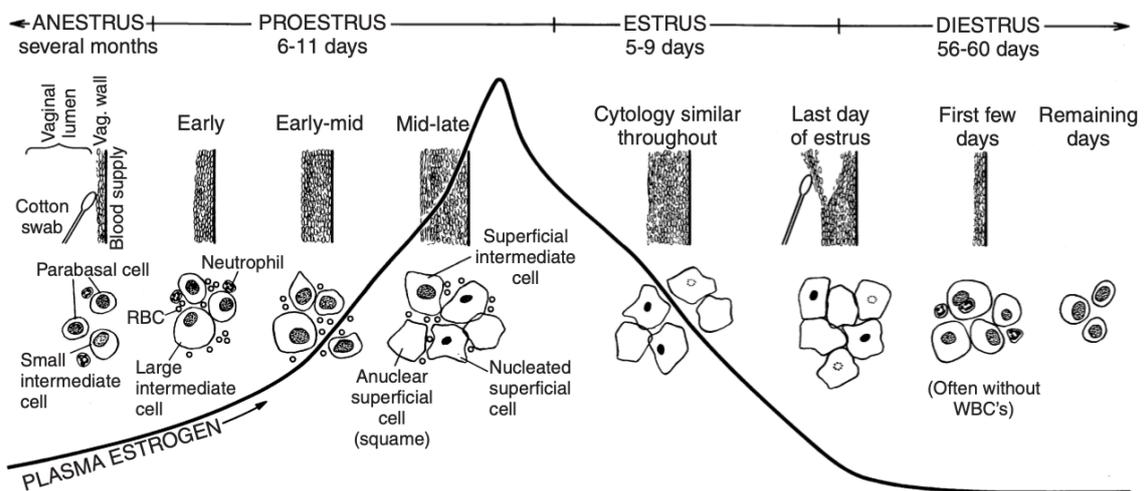
On peut dater le début du dioœstrus par une diminution en vingt-quatre heures d'au moins 20% de la proportion des cellules kératinisées. Le frottis présentera alors plus de 50% de cellules parabasales et intermédiaires (Johnston *et al.*, 2001 ; Luc, 2005).

1.1.2.4 L'anœstrus

L'anœstrus est une période s'écoulant entre 2 et 10 mois, au cours de laquelle les sécrétions vaginales sont quasi inexistantes et la vulve est de petite taille. Il correspond à une phase de mise au repos de l'activité ovarienne. Chez la chienne une discrète croissance folliculaire persiste cependant. Il existe de grandes variabilités raciales et individuelles concernant la durée de l'anœstrus (Feldman et Nelson, 2004a ; Constant *et al.*, 2019).

À l'examen cytologique, le frottis est paucicellulaire avec plus de 90 % de cellules parabasales et intermédiaires (Concannon, 1986 ; Johnston *et al.*, 2001 ; Luc, 2005) comme le montre la figure 1 ci-dessous.

Figure 1 : Evolution cellulaire du frottis vaginal au cours du cycle sexuel de la chienne (Feldman et Nelson, 2004a)



Several months : plusieurs mois ; *days* : jours ; *vaginal lumen* : lumière du vagin ; *vag. wall* : paroi vaginale ; *cotton swab* : coton-tige ; *early* : début d'une phase de cycle ; *early-mid* : première moitié d'une phase de cycle ; *mid-late* : deuxième moitié d'une phase de cycle ; *cytology similar throughout* : lame de frottis similaire pendant toute la durée de la phase ; *last day* : dernier jour ; *first few days* : les premiers jours ; *remaining days* : jours restants jusqu'à la fin de la phase

Small intermediate cell : petite cellule intermédiaire ; *parabasal cell* : cellule parabasale ; *RBC* : hématies ; *neutrophil* : neutrophiles ; *anuclear/nucleated superficial cell* : cellule superficielle kératinisée anuclée/nuclée ; *superficial intermediate cell* : cellule intermédiaire ; *Often without WBC's* : absence de leucocytes

1.1.3 Cycle ovarien

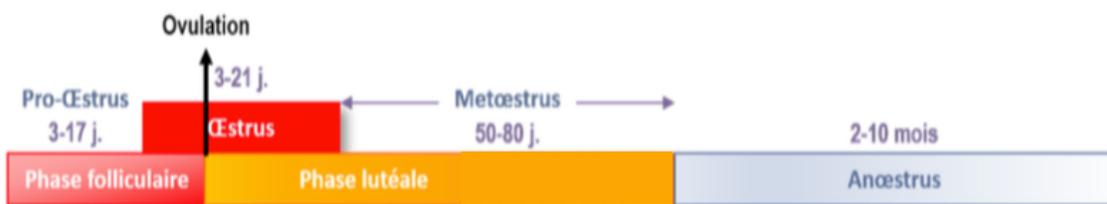
1.1.3.1 Définition

Le cycle ovarien correspond aux événements cellulaires ovariens.

La croissance terminale et la maturation des follicules correspondent à la phase folliculaire. Elle est terminée par l'ovulation. La formation et le maintien du corps jaune qui découle de l'ovulation est la phase lutéale.

La phase folliculaire dure en moyenne 3 semaines, tandis que la phase lutéale dure deux mois. L'ovulation marque le passage de la phase folliculaire à la phase lutéale. Ces événements sont récapitulés sur la figure 2 suivante.

Figure 2 : Evènements ovariens en fonction du cycle de la chienne (Constant, 2019)



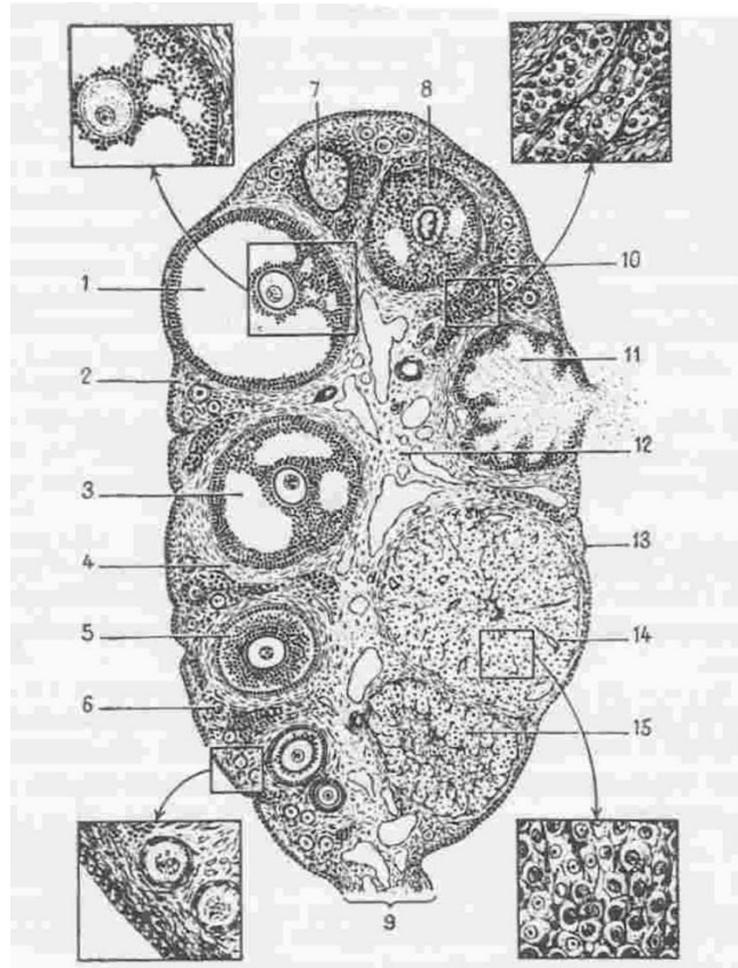
Le processus de formation du gamète femelle ou ovogenèse est indissociable du développement folliculaire ou folliculogénèse. En effet, l'ovocyte est contenu la majorité du temps de son développement au sein de son follicule (Gayrard, 2018).

Chez les mammifères, l'ovogenèse démarre au stade fœtal et les ovocytes alors constitués sont bloqués en prophase 1 de méiose lors de la formation des follicules primordiaux autour des ovocytes. L'ovocyte est alors entouré d'une petite couche cellulaire. Chez la chienne on note la spécificité de la présence inconstante de follicules poly-ovocytaires. Après l'ovulation, ils reprennent leur développement jusqu'au stade de métaphase de deuxième division méiotique. Enfin, ils ne finissent leur deuxième division méiotique que si la fécondation a lieu (Chastant-Maillard *et al.*, 2011 ; Gayrard, 2018).

Les follicules vont tour à tour suivre le développement de l'ovaire et évoluer petit à petit en fonction du stade du cycle de la chienne en follicules tertiaires comme le montre la figure 3 ci-dessous (Klein et Mayer, 1963 ; Reynaud *et al.*, 2005 ; Tiret, 2017a ; Gayrard, 2018 ; Constant *et al.*, 2019).

En période d'anœstrus il y a toujours une croissance folliculaire en follicules antraux, cependant il n'y a pas de croissance folliculaire terminale et les diamètres sont faibles entre 0,6 et 1 millimètres (mm) (Reynaud *et al.*, 2006).

Figure 3 : Schéma d'un ovaire et des différents stades du cycle ovarien (Klein et Mayer, 1963)



Légende : 1 : Follicule de Graaf ; 2 : albuginée ; 3 : follicule tertiaire ; 4 : thèque ; 5 : follicule primaire en croissance ; 6 : follicule primordial ; 7 : *corpus albicans* ; 8 : follicule atrétique ; 9 : hile ; 10 : tissu interstitiel ; 11 : follicule rompu ; 12 : médulla ; 13 : épithélium germinatif ; 14 : corps jaune ; 15 : corps jaune en régression.

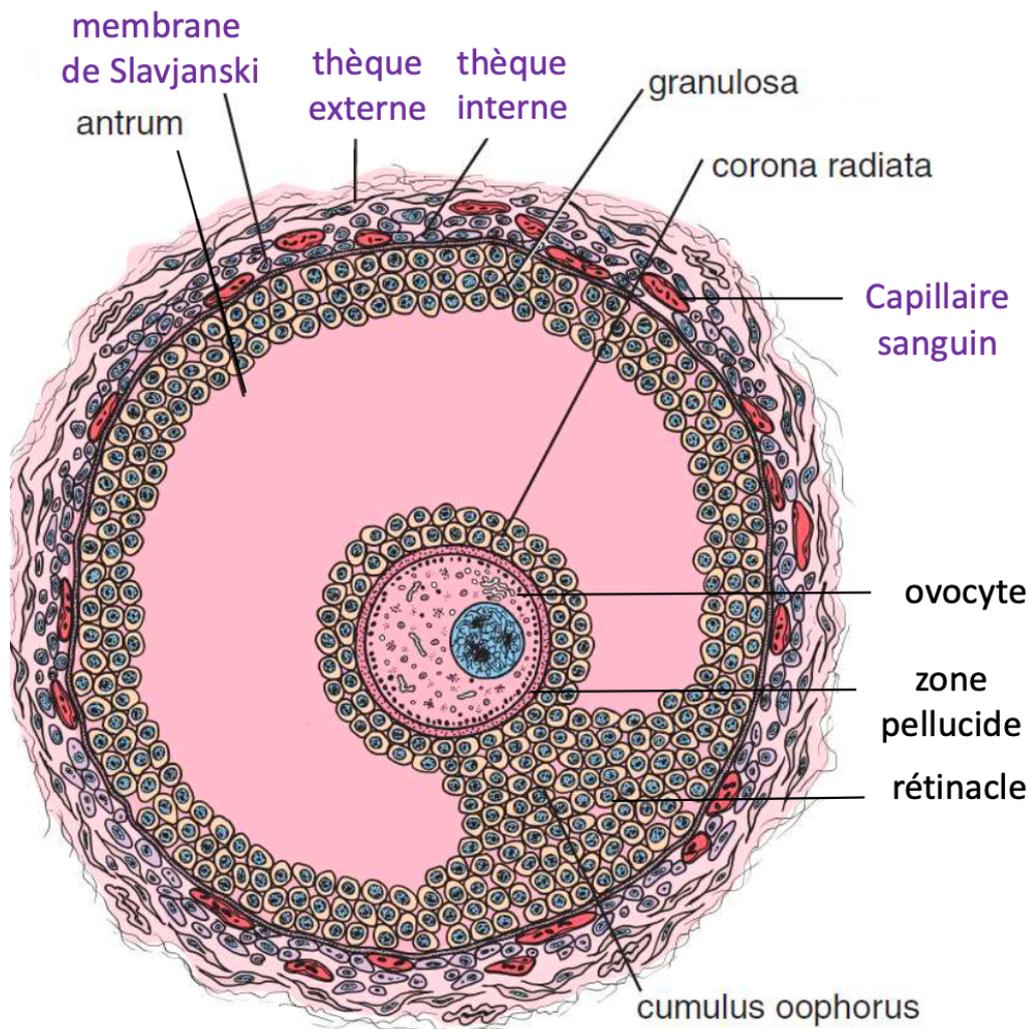
1.1.3.2 Phase folliculaire

La phase folliculaire correspond à la folliculogénèse terminale c'est-à-dire la croissance terminale des follicules.

Les follicules sont recrutés à partir de la réserve ovarienne. Ainsi, à chaque cycle, il y a recrutement de quelques follicules primordiaux du stock prédéterminé.

Durant le proœstrus, la phase folliculaire débute et quelques follicules de taille 1 à 1,5 mm grandissent et atteignent des tailles entre 1,5 et 5 mm. Pendant l'œstrus leur taille croît encore jusqu'à atteindre la taille de follicules pré-ovulatoires entre 5 et 7 mm en moyenne (Reynaud *et al.*, 2006), les follicules de Graaf ou mûrs dont la structure histologique est représentée d'après la figure 4 ci-dessous.

Figure 4 : Structure histologique d'un follicule ovarien mur, modifié par Cordonnier N. (UC78) 2019, d'après Ross and Pawlina (Histology, a text and atlas. 6th edition)



1.1.3.3 Ovulation

L'ovulation est induite par un pic d'hormone lutéinisante (LH) de longue durée (36 à 80 heures) dans un délai autour de 24 à 36h après le pic (Reynaud *et al.*, 2006 ; Concannon, 2009 ; Chastant-Maillard *et al.*, 2011).

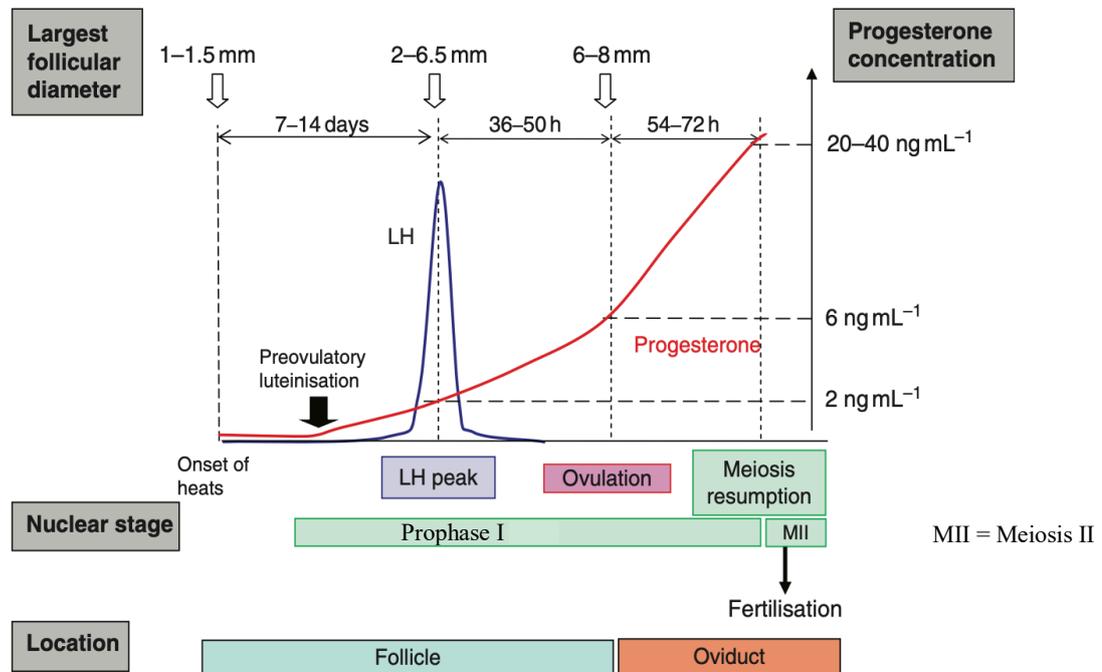
Il y a alors plusieurs ovulations de follicules mûrs, en moyenne 4 à 8 (Gayraud, 2018) dont le nombre varie en fonction de la taille et de la race de la chienne. En moyenne les chiennes de grand format ovulent un plus grand nombre d'ovocytes que les petites races : en moyenne 5,5 +/- 0,7 ovulations chez les petites races et 10,1 +/- 1,4 chez les grandes (Reynaud *et al.*, 2006).

On ne sait pas à ce jour si les follicules poly-ovocytaires ovulent de plusieurs ovocytes. Les follicules non mûrs s'atréfont quant à eux (Tiret, 2017a)

Chez la chienne, contrairement aux autres espèces, le pic de LH n'induit pas la reprise méiotique de l'ovocyte qui reste alors en stade de prophase 1 lors de l'ovulation. Il poursuit en effet sa méiose entre 48 et 72 heures passées dans l'oviducte (Fontbonne *et al.*, 2005) où il reste fécondable 3 à 5 jours au maximum (Tsutsui *et al.*, 2009).

Il existe en outre chez la chienne une particularité : c'est la lutéinisation pré-ovulatoire. On observe en effet une augmentation du taux de progestérone circulante avant l'ovulation. Ces variations de concentration seront vues dans la partie 1.1.4.2.1 (Concannon, 2009). La figure 5 ci-dessous récapitule les événements ovocytaires, folliculaires et endocriniens autour de l'ovulation.

Figure 5 : Evolution terminale de la phase folliculaire et ovulation sous contrôle endocrinien (Chastant-Maillard, 2011)



1.1.3.4 Phase lutéale

Chez les mammifères, après expulsion de l'ovocyte, les cellules de la thèque et de la granulosa restant dans le follicule vont subir des transformations en cellules glandulaires appelées lutéales.

Les cellules de la granulosa vont se multiplier, grandir et se charger d'un pigment appelé lutéine. Les cellules de la thèque interne se mélangent aux cellules de la granulosa. Elles vont sécréter la même hormone pendant au moins deux mois : la progestérone et sont responsables de la lutéinisation pré-ovulatoire au stade cavaire

du follicule tertiaire (Tiret, 2017a ; Cordonnier, 2020). Le corps jaune est alors fonctionnel et la phase lutéale s'étend sur toute la durée de maintien du corps jaune, jusqu'à sa lutéolyse.

La phase lutéale se poursuit chez la chienne en moyenne pendant 70 jours (55 à 80) chez les femelles non gestantes, et pendant 64 +/- 1 jours (62 à 65) chez les femelles gestantes (Concannon, 2010). Elle se termine par la lutéolyse qui arrive à la fin du metœstrus et qui correspond à la régression du corps jaune par l'action de la prostaglandine sécrétée par les cellules de l'endomètre à la fin du metœstrus.

1.1.4 Endocrinologie du cycle

La période des chaleurs chez la chienne se divise en deux phases au niveau ovarien : la phase folliculaire et la phase lutéale. L'ancœstrus correspond quant à lui à une absence de signes d'activité externe ovarienne (Concannon, 1986), mais on observe tout de même une croissance folliculaire sans différenciation folliculaire terminale (Viaris de Lesegno, 2007 ; Constant *et al.*, 2019).

La phase folliculaire est la phase de croissance des follicules ovariens. Elle démarre une dizaine de jours avant le proœstrus. Elle se termine par les ovulations en début d'œstrus s'étalant sur environ deux jours. La phase lutéale correspond à la phase de régression des follicules non sélectionnés, correspondant à ceux dont la croissance n'a pas été poursuivie pour devenir des follicules ovulatoires, et la mise en place de corps jaunes après l'ovulation. Différentes hormones sont sécrétées et permettent de comprendre les modifications ovariennes, comportementales et anatomiques vues précédemment.

1.1.4.1 Description des hormones impliquées dans le cycle sexuel de la chienne

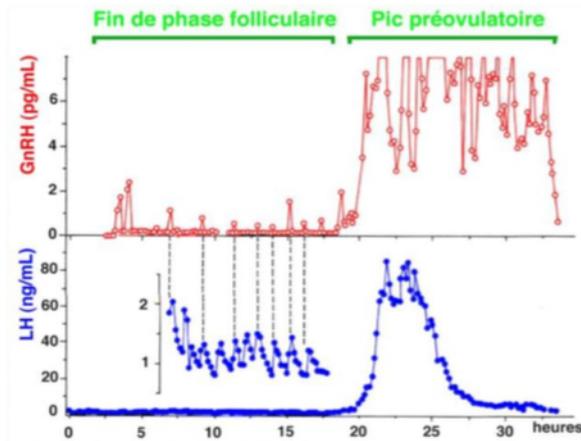
1.1.4.1.1 Une hormone hypothalamique : la gonadolibérine (GnRH)

L'hypothalamus est le centre régulateur de la reproduction. La GnRH est produite par l'aire pré-optique de l'hypothalamus antérieur et a une action de stimulation de la production des hormones gonadotropes LH (*Luteinizing Hormone*) et FSH (Hormone Folliculo-Stimulante) par l'hypophyse antérieure (Concannon, 1986 ; Constant *et al.*, 2019).

Chez le mâle et la femelle, une sécrétion pulsatile constante de faible amplitude de GnRH en pg (picogrammes) provoque une sécrétion basale de LH et FSH dont l'action sera vue dans la paragraphe suivant.

Chez la femelle uniquement, il se produit en toute fin de proœstrus une sécrétion phasique d'amplitude élevée de GnRH en plusieurs centaines de ng (nanogrammes) qui provoque le pic pré-ovulatoire de LH comme le montre la figure 6 ci-dessous. Cette production plus élevée de GnRH est induite par un contexte hormonal de faible concentration sérique en progestérone et de forte concentration en œstrogènes.

Figure 6 : Lien entre concentration sérique entre GnRH et LH au moment de l'ovulation (Tiret, 2017b)



Pendant le proœstrus une sécrétion pulsatile de GnRH de faible amplitude permet une sécrétion basale et pulsatile de LH concomitante (lignes pointillées). Juste avant le pic de LH préovulatoire, on observe une libération massive de GnRH : l'aire sous la courbe rouge est considérablement augmentée : cette décharge massive de GnRH induit une décharge massive de LH.

1.1.4.1.2 Les gonadotropines : Hormone Lutéinisante (LH) et Hormone Folliculo-Stimulante (FSH)

La LH et la FSH sont produites par les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure stimulées par l'action de la GnRH. Elles ont des rôles distincts et complémentaires. La FSH a pour fonction la croissance terminale des follicules pré-antraux ayant exprimé ses récepteurs à la surface des cellules de la granulosa. Elle entraîne également la synthèse d'œstrogènes et d'inhibine par ces follicules. Ces hormones synthétisées effectuent un rétrocontrôle sur la production de FSH (Concannon, 2009 ; Tiret, 2017b).

La LH ou hormone lutéinisante stimule les cellules de la thèque interne du follicule qui expriment des récepteurs. C'est une hormone stéroïdogène : à des basses concentrations (1 à 2 ng/mL) elle induit la production d'androgènes ainsi que la production de progestérone par le follicule. Elle est également responsable de l'ovulation en provoquant la rupture folliculaire lors de son pic de concentration. Enfin elle est lutéinisante permettant ainsi la mise en place du corps jaune (Concannon, 2009).

1.1.4.1.3 Les œstrogènes (E2)

Les œstrogènes sont produits par les follicules tertiaires sous l'influence de la FSH. Une cascade métabolique permet la transformation des premiers métabolites synthétisés (œstrone...) en produit final : l'œstradiol 17- β . Les concentrations élevées d'œstradiol 17- β sont responsables des comportements spécifiques de l'œstrus et des modifications associées du tractus génital comme l'hyperplasie utérine, les sécrétions glandulaires cervicales et utérines (Concannon, 1986 ; Constant *et al.*, 2019).

En phase lutéale, la faible concentration d'œstradiol 17- β permet un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des hormones gonadotropes de l'hypophyse. En phase folliculaire, à forte concentration, ils réalisent pendant un laps de temps très court un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus, stimulant la sécrétion de GnRH responsable du pic ovulatoire de LH (Roos et Fontbonne, 2017).

1.1.4.1.4 La progestérone (P4)

La progestérone est une hormone stéroïde dérivée du cholestérol plasmatique sécrétée par l'ovaire via les cellules de la thèque, les cellules de la granulosa et les cellules du corps jaune. Sa synthèse est induite par la sécrétion de LH et a pour rôle le maintien du corps jaune tout au long de la gestation ainsi que la maturation de l'endomètre au cours de la gestation. Elle inhibe les contractions utérines permettant la gestation. Elle est responsable d'un rétrocontrôle uniquement négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Tiret, 2017a ; Roos et Fontbonne, 2017).

Les rôles de la progestérone seront vus plus précisément dans la partie 1.2.

1.1.4.1.5 La relaxine

La relaxine est une hormone peptidique sécrétée par les ovaires, le tissu mammaire et le placenta ; sa concentration augmente à l'approche de la parturition. Chez la chienne, des études récentes ont montré qu'elle était également synthétisée par le corps jaune en quantité croissante de l'implantation à la mi-gestation, et cette sécrétion lutéale de relaxine diminuerait à l'approche de la parturition (Nowak *et al.*, 2018). Elle joue un rôle dans la maturation et la relaxation de l'utérus, des ligaments pelviens et du col utérin pour faciliter la parturition. La relaxine est également un indicateur d'intégrité placentaire et elle aurait un rôle lutéotrope, soit par une activation directe dirigée vers le corps jaune, soit par une action potentiellement hyperprolactinémiant (Krachudel *et al.*, 2013 ; Nowak *et al.*, 2018).

1.1.4.1.6 La prolactine

La prolactine est une hormone peptidique sécrétée par les cellules lactotropes de la partie antérieure de l'hypophyse. Chez la chienne, elle a un effet mammatrope, lactogénique et lutéotrope après les 30 premiers jours de gestation (Nowak *et al.*, 2018).

1.1.4.2 Contrôle hormonal du cycle sexuel de la chienne

Nous avons vu les différents rôles, et décrit les modifications comportementales et anatomiques des hormones du cycle sexuel de la chienne. Il reste à étudier l'évolution de leurs concentrations dont découle le cycle sexuel et ovarien de la chienne et notamment l'évolution de la progestérone qui est le cœur de notre étude.

1.1.4.2.1 Contrôle hormonal au cours du proœstrus

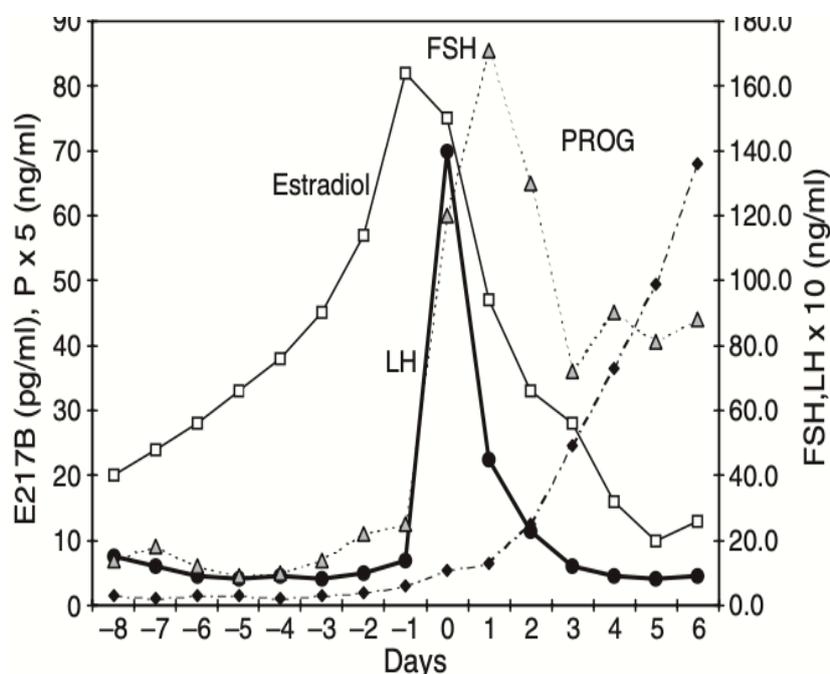
Au cours du proœstrus, le taux d'œstrogènes circulant (en particulier d'œstradiol 17- β) augmente progressivement causant la prolifération des cellules épithéliales vaginales ainsi que la kératinisation des cellules à l'approche des chaleurs. Les concentrations initiales sont faibles entre 5 et 10 pg/mL, tandis que les concentrations pré-ovulatoires atteignent des valeurs allant de 45 à 120 pg/mL au pic. À la fin du proœstrus, la quantité d'œstrogènes plasmatiques décroît et provoque en synergie avec le niveau croissant de progestérone le développement du pic de LH 12 à 36 heures après (en moyenne 24 heures), comme le montre la figure 6 (Feldman et Nelson, 2004a ; Concannon, 2009 ; Kowalewski, 2018).

La concentration et les pics pulsatiles de LH et de FSH sont faibles et de basses fréquences en début et milieu du proœstrus à cause de la quantité sérique d'œstrogènes élevée réalisant un feedback négatif. En fin de proœstrus, avec la diminution de la concentration d'œstrogènes et l'augmentation de la progestérone, les concentrations de LH augmentent considérablement jusqu'à 4 à 40 ng/mL (8-15 ng/mL en moyenne) pour atteindre le pic de LH marquant la fin du proœstrus (Concannon, 1977 ; Concannon, 2009 ; Kowalewski, 2018).

Le pic de LH dure en moyenne 24 à 72 heures. Sa durée est longue chez la chienne (environ 36 heures plus ou moins 5 heures) comparée à d'autres espèces pour lesquelles elle est plutôt de 8 heures. Le pic de LH est toujours accompagné d'un pic de FSH simultané ou le précédant de quelques heures (110 heures en moyenne).

Cette évolution est décrite dans la figure 7 ci-dessous. La progestérone lors de la lutéinisation pré-ovulatoire présente une augmentation modérée de la concentration de progestérone jusqu'à 6 jours avant le pic de LH. Elle passe progressivement d'un niveau basal (de 0,2 à 0,4 ng/mL) à un niveau plus élevé (entre 1,0 ng/mL et $2,7 \pm 0.6$ ng/ml selon les auteurs) comme le montre la figure 7. Cette hausse de concentration est nécessaire pour que le pic de LH soit déclenché par rétrocontrôle positif. Après le pic de LH, la concentration de progestérone augmente rapidement à des niveaux élevés de 5 jusqu'à 10 ng/mL coïncidant avec le moment de l'ovulation (Concannon, 1977 ; Kowalewski, 2018 ; Hollinshead et Hanlon, 2019).

Figure 7 : Concentrations moyennes sériques (sur 8 femelles Beagle) d'œstradiol, de progestérone, de LH et FSH pendant le proœstrus et l'œstrus, (Concannon, 2009)

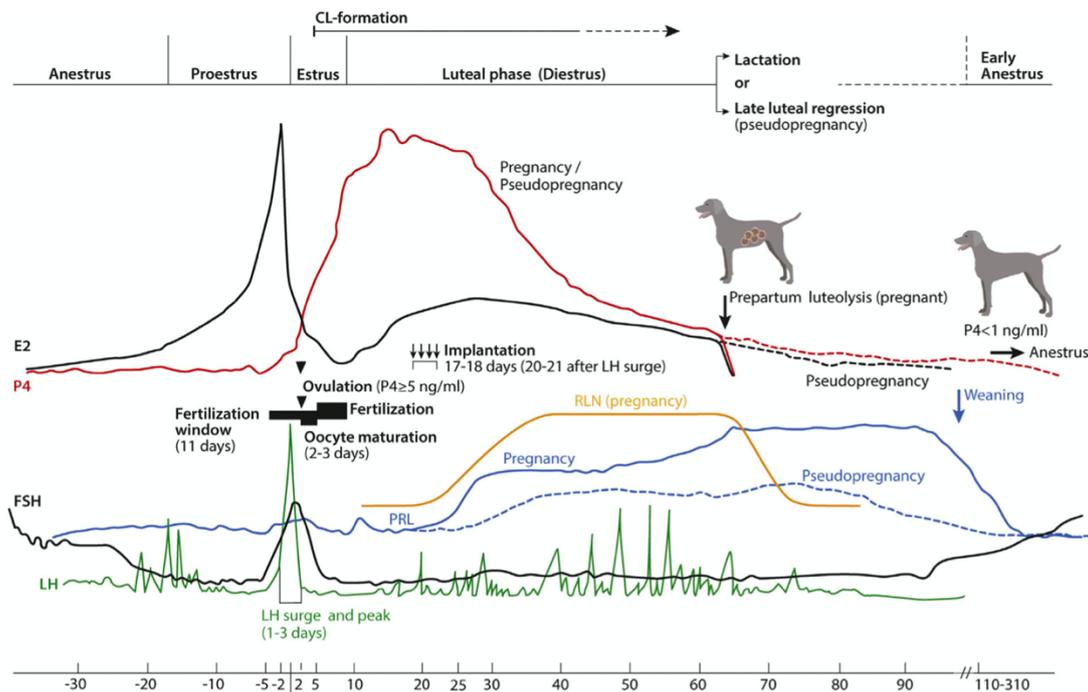


1.1.4.2.2 Contrôle hormonal au cours de l'œstrus

Le pic de LH marque la transition du proœstrus vers l'œstrus et les changements comportementaux d'acceptation du mâle sont déclenchés hormonalement par les taux d'œstrogènes élevés. L'ovulation est déclenchée 24 à 72 heures après le pic de LH (Feldman et Nelson, 2004a).

La quantité d'œstrogènes plasmatiques continue de diminuer à des valeurs intermédiaires de 10 à 20 pg/mL jusqu'à la fin de l'œstrus comme le montre la figure 8 ci-dessous. Simultanément la concentration plasmatique de la progestérone continue d'augmenter fortement atteignant des valeurs entre 10 et 25 ng/mL vers la fin de l'œstrus, et atteint parfois même des valeurs encore plus élevées (Feldman et Nelson, 2004a ; Concannon, 2010 ; Kowalewski, 2018).

Figure 8 : Résumé des différentes évolutions hormonales au cours du cycle de la chienne (Kowaleski, 2018)



1.1.4.2.3 Contrôle hormonal au cours du diœstrus

Au début du diœstrus les concentrations d'œstradiol 17- β sont d'un niveau intermédiaire à bas (15 pg/mL) puis elles continuent de diminuer jusqu'à des valeurs basales (8–9 pg/mL). Dans un second temps, la formation du corps jaune associée à une croissance de la concentration en progestérone conduisent à une augmentation d'œstradiol 17- β vers le 10^e jour, allant de 15 à 40 pg/mL au long du diœstrus. Cette concentration diminue ensuite avec la lutéolyse progressive à la fin du diœstrus (Kowalewski, 2018).

La concentration en progestérone continue d'augmenter 15 à 30 jours après formation totale du corps jaune (sous influence au début de la phase lutéale des prostaglandines) jusqu'à des valeurs moyennes allant de 30 à 35 ng/mL. Ces valeurs s'étendent de 15 à 85 ng/mL d'après Concannon (2009). Après avoir atteint son pic de concentration, il y a une diminution progressive de la quantité de progestérone circulante à partir du 35^e jour post-ovulation correspondant à la régression lutéale simultanée.

La chienne gestante présente la particularité d'une chute brutale (jusqu'à des valeurs inférieures à 2 ng/ml) du taux de progestérone 18 à 24 heures en moyenne (18 heures d'après Concannon (2009)) avant la mise-bas par lutéolyse totale. Tandis que chez la chienne non gestante, la progestérone continue de décroître progressivement jusqu'à atteindre des valeurs basales, en moyenne 75 jours après l'ovulation (Concannon, 2009 ; Kowalewski, 2018). Le diœstrus prend fin quand la progestérone passe en dessous de 1 ng/ml (Jeffcoate, 1998).

1.1.4.2.4 Contrôle hormonal au cours de l'anœstrus

Jusqu'à une semaine avant le proœstrus, le niveau de LH est bas (<1 ng/mL) avec des pics toutes les 4 à 24 heures pouvant atteindre occasionnellement des niveaux entre 5 et 25 ng/mL. Une semaine avant le proœstrus, des petits pics de LH se multiplient toutes les 60 à 90 min avec une moyenne de concentration au-dessus de 3 ng/mL. La concentration de FSH sérique augmente au milieu de l'anœstrus jusqu'à atteindre, en fin d'anœstrus, des niveaux aussi hauts que le pic de FSH pré-ovulatoire. L'hypothèse retenue pour ces valeurs hautes en anœstrus est que la FSH permet le recrutement des follicules pendant l'anœstrus pour le cycle ovarien suivant. Une fois recrutés, ces follicules régulent la sécrétion des hormones gonadotropes par un feedback négatif et la concentration en FSH et LH diminue (Concannon, 2009 ; Kowalewski, 2018).

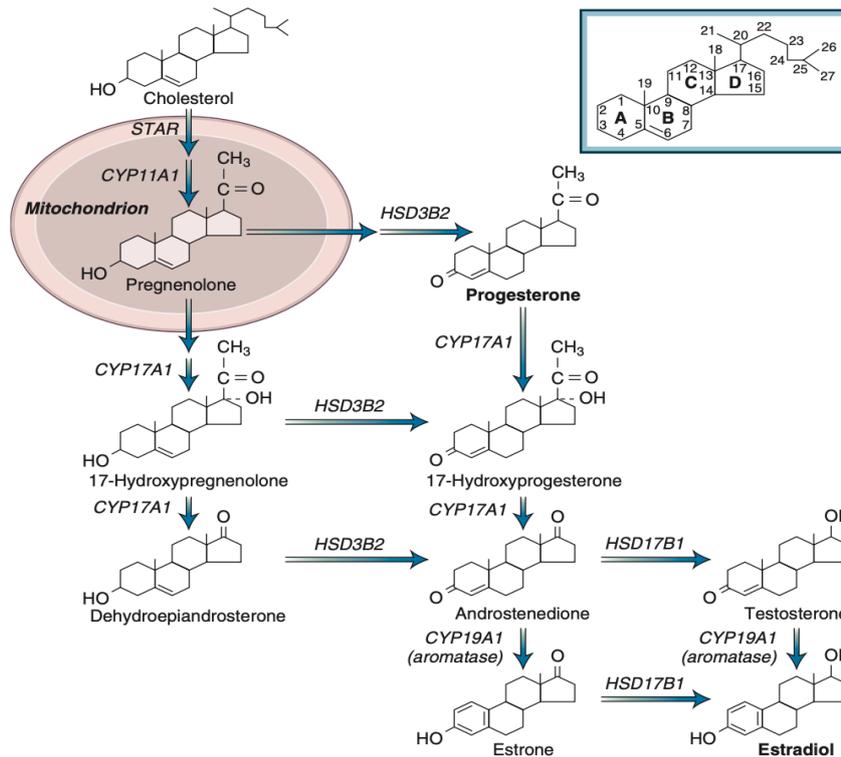
Les concentrations d'œstradiol 17- β sont basales au long de l'anœstrus et augmentent légèrement 10 à 20 jours avant le proœstrus tandis que les concentrations de progestérone restent basales (Jeffcoate, 1998).

1.2 Métabolisme et rôle de la progestérone chez la chienne

1.2.1 Description

La progestérone est une hormone gonadique stéroïdienne, dérivée du cholestérol et constituée de vingt et un atomes de carbone, d'une double liaison en C4-C5 et de deux fonctions cétones. Son poids moléculaire est de 314 daltons. La progestérone est chimiquement la Pregn-4-ene-3,20-dione, abrégée en P4. Le chiffre 4 rappelle la présence de la double liaison sur le C4. Elle est sécrétée majoritairement par le corps jaune ovarien, et en petite quantité par les surrénales. Comme la plupart des dérivés du cholestérol, elle est peu soluble dans l'eau. C'est une hormone à l'origine de la synthèse d'autres hormones stéroïdiennes comme les androgènes et les œstrogènes, dont le mécanisme est expliqué dans la figure 9 ci-dessous. (Henricks, 1991 ; Blanchard, 2006 ; Bulun, 2016).

Figure 9 : Biosynthèse des hormones stéroïdogènes ovariennes à partir de la progestérone chez l'humain, (Bulun, 2016)



La progestérone est sécrétée à partir du cholestérol via une chaîne de réactions enzymatiques après un passage mitochondrial comme décrit sur le schéma. Elle est également un précurseur possible d'œstradiol ou de testostérone.

1.2.2 Transport

La progestérone étant insoluble dans le plasma, son transport est majoritairement réalisé par liaison avec des protéines de transport. La progestérone se lie soit à l'albumine, soit à la transcortine ou *Corticoid Binding Globulin* (CBG). Ces protéines de transport qui sont de grande taille (environ 50 kDa) assurent également une protection contre la dégradation de la progestérone et son excrétion dans la bile ou les urines (Blanchard, 2006 ; Bulun, 2016).

La fraction libre de la progestérone représente environ 5% de l'hormone circulante, contre 95% de fraction liée. Son stockage est réalisé majoritairement dans les tissus adipeux. Seule la progestérone libre peut pénétrer dans les cellules cibles. La liaison avec la CBG est réversible, à l'aide de protéinases qui modifient l'affinité de la CBG pour la progestérone à proximité des cellules cibles. Le mécanisme de délivrance de la progestérone aux cellules-cibles n'est cependant pas encore totalement élucidé (Lin *et al.*, 2010).

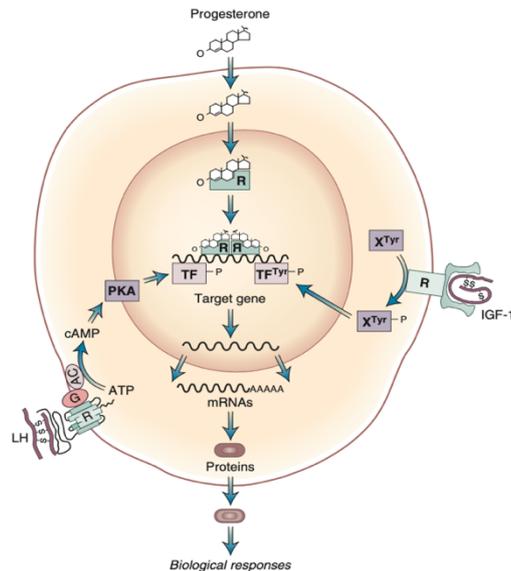
1.2.3 Mécanisme d'action

La progestérone liposoluble entre dans les cellules cibles par diffusion passive. Elle se lie ensuite à un récepteur nucléaire à la progestérone appelé PR (Progestérone Récepteur). Ce récepteur est un récepteur à deux sous-unités de fonction différente : la première se lie à la progestérone, la seconde est capable de se « lier » à certains sites de l'ADN nucléaire et d'en réguler la transcription. Lorsque la progestérone se lie à son récepteur, ce dernier voit sa conformation changer et il acquiert une meilleure affinité pour certains segments d'ADN. Les sites de liaison au complexe progestérone-PR sont largement répartis dans le génome, et on suspecte la nécessité de boucles ADN pour modifier la transcription des gènes ciblés car les promoteurs ADN sont situés loin des sites d'affinité avec le complexe progestérone-PR. Une fois la transcription initiée, le complexe progestérone-PR se dissocie et les ARN messagers transcrits passent dans le cytoplasme où ils sont traduits en protéines. Le mécanisme d'action est décrit par la figure 10 ci-dessous. Les cellules cibles sur lesquelles la progestérone agit sont les cellules endométriales, vaginales, mammaires et hypophysaires (Henricks, 1991 ; Blanchard, 2006 ; Bulun, 2016).

Il existe deux récepteurs nommés PR-A et PR-B. Ces deux récepteurs sont codés par des gènes distincts et ne sont pas situés sur les mêmes cellules cibles. Le récepteur PR-A est majoritairement présent dans l'ovaire et le tractus génital. Le récepteur PR-B est plutôt situé dans la glande mammaire. L'action de la progestérone dans les différents tissus dépend donc de la modification transcriptionnelle effectuée par ses différents récepteurs (Mulac-Jericevic et Conneely, 2004).

Une des fonctions majeures est l'action anti-œstrogénique via une stimulation de l'activité d'une 17 β -déshydrogénase, permettant la conversion de l'œstradiol en œstrone, métabolite moins actif. En effet, les effets directs sur les organes génitaux (endomètre, myomètre, col utérin, glande mammaire) de la progestérone et des œstrogènes sont opposés. Les œstrogènes vont être par exemple responsables de la prolifération des cellules de l'endomètre tandis que la progestérone stoppe cette prolifération pour permettre une différenciation des fibroblastes en glandes sécrétoires. De la même manière, la progestérone a pour rôle de maintenir l'immobilité du myomètre alors que l'œstradiol favorise sa contraction (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997).

Figure 10 : Mode d'action et récepteurs de la progestérone, (Bulun 2016)



La progestérone diffuse à travers la membrane et se lie à son récepteur R sur le schéma. Le complexe ainsi formé se fixe sur des segments de l'ADN nucléaire et active la transcription du gène d'intérêt en ARN messager. Les protéines ensuite traduites sont responsables des actions biologiques de la progestérone.

1.2.4 Catabolisme

La progestérone, comme toutes les hormones stéroïdes, est catabolisée principalement dans le foie. Sa demi-vie est courte : entre 3 minutes et 90 minutes. Les catabolites devenus inactifs et hydrosolubles, sont éliminés dans les urines (à 90%) et les fèces (10%) par l'intermédiaire de la bile avec un taux de clairance métabolique chez la femme allant de 2100 à 2800 litres par jour (Aufrère et Benson, 1976 ; Blanchard, 2006).

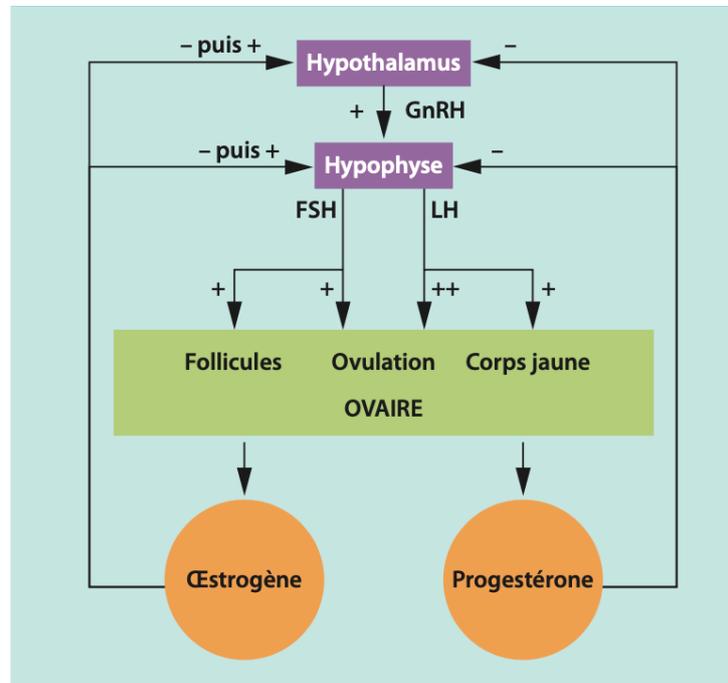
1.2.5 Rôle de la progestérone

1.2.5.1 Ovulation

Comme vu précédemment, la progestérone possède un rôle capital dans le contrôle de l'ovulation au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans le noyau arqué hypothalamique. Grâce à son rétrocontrôle négatif de la sécrétion de GnRH, elle module la sécrétion de nombreuses hormones comme la FSH et la LH. La progestérone induit une diminution de la fréquence des pulses de FSH et de LH avec pour fonction majeure d'empêcher l'ovulation. Un rétrocontrôle positif hypophysaire est suspecté chez la femelle sous influence œstrogénique mais les données ne sont pas clairement établies encore à ce jour (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997 ; Feldman et Nelson, 2004a ; Blanchard, 2006).

La figure 11 ci-dessous résume brièvement les rétrocontrôles de la progestérone sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique.

Figure 11 : Régulation hormonale de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien, (Roos et Fontbonne 2017)



GnRH : gonadolibérine ; LH : hormone lutéinisante ; FSH : hormone folliculo-stimulante.

La progestérone sécrétée par le corps jaune exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus en freinant la sécrétion de GnRH et donc de FSH et LH pour permettre le maintien de la gestation.

1.2.5.2 Contrôle de l'implantation et de la nidation

La progestérone intervient de façon majeure lors de l'implantation, définie comme la mise en place des contacts cellulaires étroits entre la membrane externe de l'embryon (chorion) et l'endomètre aboutissant à la formation du placenta. En effet, son élévation rapide après le pic de LH permet le développement sécrétoire de l'endomètre. Elle stimule l'activité enzymatique d'une cathepsine et de la monoamine oxydase, l'hypertrophie de l'épithélium endométrial, et la synthèse des récepteurs membranaires aux prostaglandines. Elle permet une adhésivité accrue de l'épithélium utérin grâce à la stimulation du développement de pinopodes (petites protrusions endométriales) et d'expansions cellulaires à la surface apicale de l'épithélium (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997 ; Gayrard, 2018).

Elle augmente également l'expression de protéines d'adhésions et diminue celle des protéines anti-adhésives. Enfin, elle stimule les sécrétions glandulaires endométriales qui constituent une source de nutriment pour l'embryon. Elle provoque des modifications histologiques des glandes qui stimulent l'activité enzymatique d'une phosphatase acide créant une accumulation de glycogène, de mucopolysaccharides

et de lipides. La progestérone assure donc la production de facteurs nutritifs permettant la survie de l'embryon. En phase sécrétoire, ces modifications permettent de créer une « fenêtre de réceptivité » de l'endomètre utérin, contrôlant ainsi l'implantation et la nidation (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997 ; Bulun, 2016 ; Gayrard, 2018).

1.2.5.3 Contrôle de la gestation

La progestérone a un rôle prépondérant dans le maintien de la gestation. Sans une concentration minimale de progestérone, la gestation n'est pas possible. Un cas particulier appelé insuffisance lutéale sera vu dans la partie I.3.1.5. En effet, son action majeure concerne le myomètre dont elle assure la relaxation pendant la gestation en diminuant sa contractilité. La progestérone possède en effet une action frénatrice sur la conductibilité des fibres musculaires du myomètre en inhibant la synthèse des jonctions communicantes et en séquestrant les ions calcium dans les citernes du réticulum sarcoplasmique. De ce fait, elle contrôle l'immobilité de l'utérus pendant la gestation. Elle agit également sur la musculature du col, en participant à sa fermeture et donc au maintien de la gestation (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997 ; Gayrard, 2018).

Elle participe en outre aux modifications immunologiques nécessaires pour éviter un rejet de l'embryon par l'organisme maternel (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997 ; Constant *et al.*, 2019).

1.2.5.4 Contrôle du développement mammaire et de la lactation

La progestérone permet le développement des lobules mammaires en synergie avec l'œstradiol et la GH (*Growth Hormone*) hypophysaire en stimulant la différenciation des galactophores en acini. Elle s'oppose cependant à l'œstradiol en limitant la perméabilité capillaire, la prolifération galactophore et en réduisant l'œdème de la mamelle (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997).

La progestérone agit au niveau des cellules épithéliales souches situées à l'extrémité des canaux mammaires et limite l'augmentation du nombre de récepteurs de la prolactine. Cela permet de limiter l'effet lactogène de la prolactine durant la mammogenèse (Gayrard, 2018).

La progestérone inhibe de plus la sécrétion de lait durant la gestation en bloquant la transmission de la prolactine au niveau de la cellule mammaire et en bloquant la synthèse de la lactalbumine et du lactose pendant la gestation. C'est donc une hormone inhibitrice de la lactation (Mauvais-Jarvis *et al.*, 1997 ; Blanchard, 2006).

1.2.5.5 Autres fonctions générales de la progestérone

La progestérone possède en outre d'autres fonctions par exemple de vasoconstriction utérine chez la ratte, de protection neuronale, ou encore de développement de glandes cutanées. Tous ses mécanismes d'actions n'ont pas encore été totalement élucidés (Blanchard, 2006).

1.3 Applications du dosage de la progestérone

Nous avons vu que la progestérone était l'hormone indispensable au contrôle du déclenchement de l'ovulation, à la nidation et au maintien de la gestation. C'est donc un marqueur extrêmement utile dans le contrôle de la reproduction de la chienne. Il est ainsi indiqué de doser la progestérone canine dans de nombreux cas, que ce soit pour une exploration d'infertilité, de causes d'avortements, pour diagnostiquer certaines pathologies ou encore pour réaliser un suivi de chaleurs et de gestation. Nous allons développer les différentes applications du dosage de la progestérone chez la chienne.

1.3.1 Applications du dosage de la progestérone dans un cycle normal

1.3.1.1 Méthode et réalisation d'un suivi de chaleurs

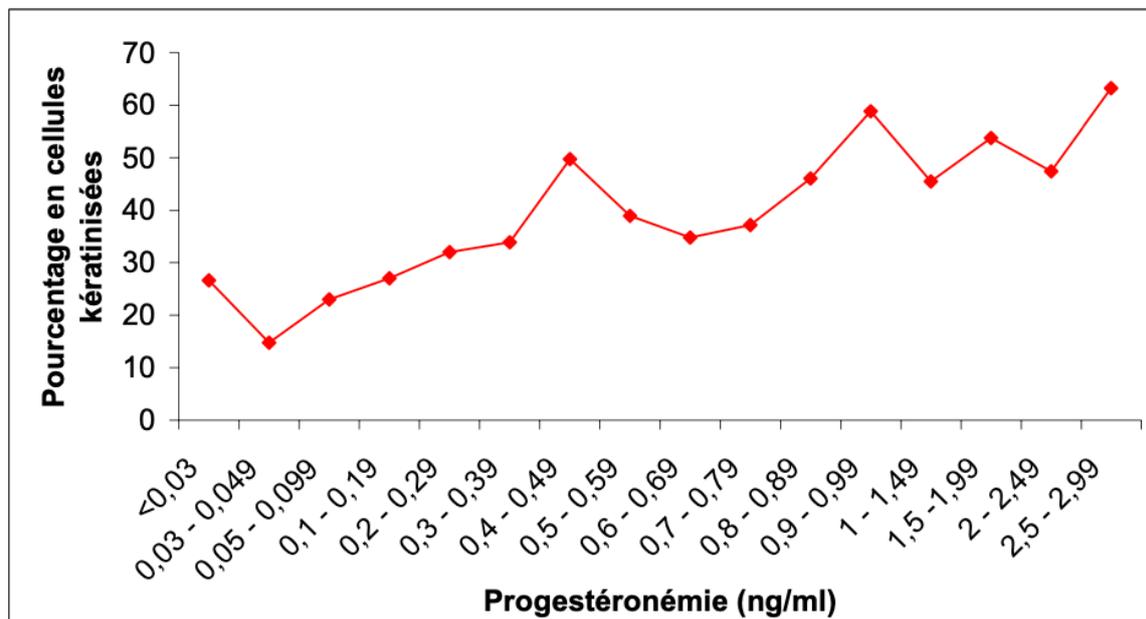
1.3.1.1.1 Méthode de référence : dosage de la progestérone couplé au frottis vaginal

Le dosage de la progestérone est utilisé en clinique vétérinaire pour réaliser un suivi de chaleurs chez les chiennes destinées à la reproduction afin de déterminer le moment idéal de fécondité. Nous avons vu que les concentrations de progestérone restent basales au cours du proœstrus et augmentent légèrement jusqu'à 1ng/mL en s'approchant de l'œstrus.

La réalisation de nombreux dosages de progestérone étant impossible dans la majeure partie des cas en raison du coût occasionné, il est donc plutôt recommandé de suivre le proœstrus avec la réalisation de frottis vaginaux pour évaluer le stade dans lequel se situe la chienne (S. D. Johnston *et al.*, 2001).

En effet, une thèse portant sur le suivi de chaleurs des chiennes venues au CERCA (Centre d'Études en Reproduction des Carnivores de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort) sur un an a pu montrer l'intérêt de la réalisation du frottis vaginal pour le suivi de chaleurs. On observe d'après la figure 12 ci-dessous que les proportions de cellules kératinisées observées au frottis permettent de se situer au cours du proœstrus. Leur pourcentage augmente au fur et à mesure de l'augmentation de la progestéronémie. Il est donc conseillé en proœstrus de réaliser des frottis vaginaux réguliers permettant au vétérinaire de décider en fonction du stade observé si un dosage de progestérone est nécessaire (Luc, 2005).

Figure 12 : Evolution du pourcentage en cellules kératinisées en fonction de la progestéronémie pour les frottis vaginaux étudiés, (Luc, 2005)



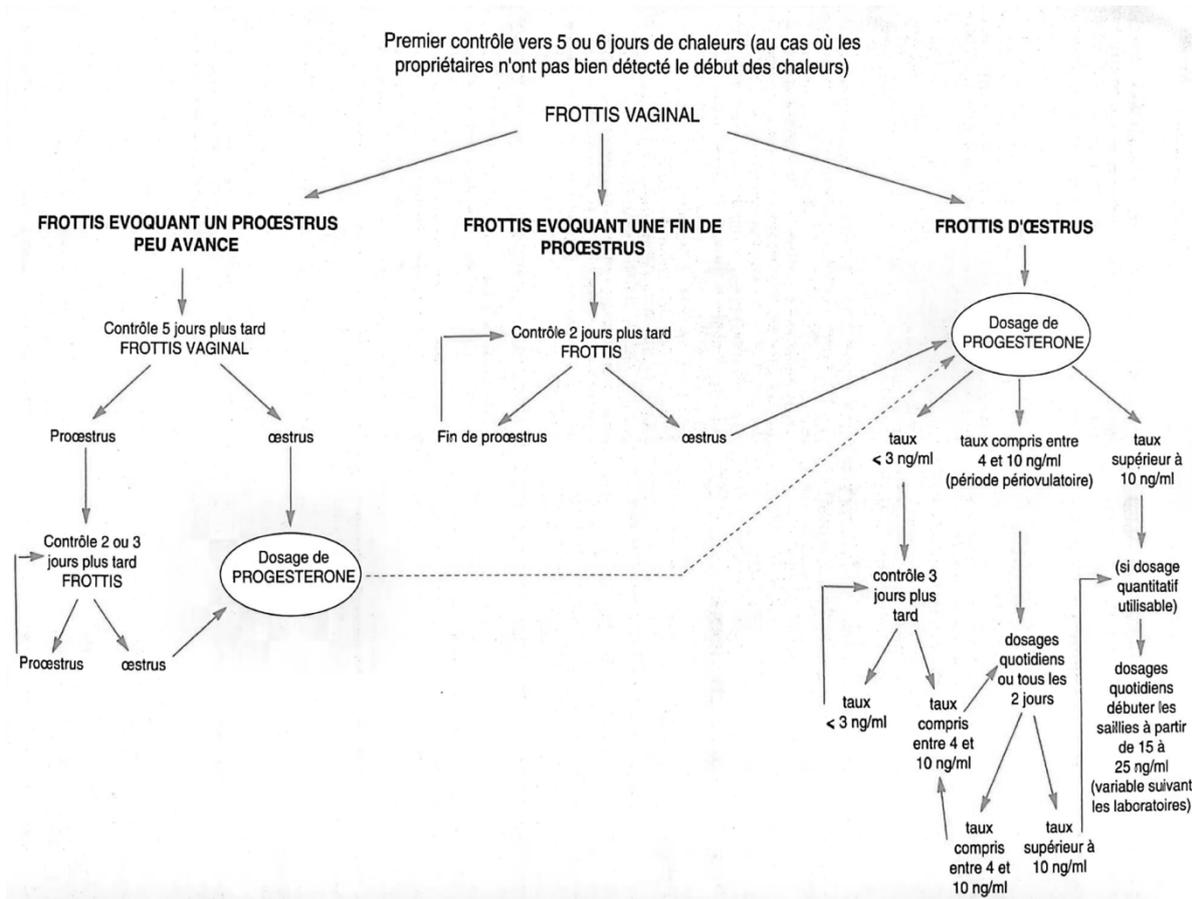
La figure 13 ci-dessous est un tableau réalisé par le même auteur permettant de situer la valeur probable de progestéronémie en fonction des pourcentages cellulaires observés au frottis. Il permet au vétérinaire de trancher selon des critères cytologiques si un dosage de progestérone est justifié.

Figure 13 : Critères cytologiques et valeurs seuil de progestéronémie, (Luc, 2005)

Critères		taux<1ng/ml	taux<1,5ng/ml	taux<2ng/ml
Présence de parabasales (151 frottis)		85,43%	91,39%	96,03%
% de parabasales + Intermédiaires basophiles	>50% (68 frottis)	94,12%	97,06%	98,53%
	>40% (76 frottis)	93,41%	94,74%	98,68%
% cellules kératinisées	<10% (131 frottis)	84,73%	90,08%	93,13%
	<25% (193 frottis)	77,20%	87,05%	92,23%
	<33% (234 frottis)	75,64%	85,90%	90,17%

La figure 14 ci-dessous présente un arbre décisionnel permettant de suivre en clinique le protocole de détection des chaleurs en fonction des différents stades de frottis couplés lorsque nécessaire au dosage de la progestérone (Fontbonne, 1992).

Figure 14 : Utilisation combinée des frottis vaginaux et des dosages de progestérone lors d'un suivi de chaleurs chez une chienne, (Fontbonne, 1992)



Lors de la mise à la reproduction, un premier frottis vaginal est préconisé 5 à 6 jours après le début des chaleurs détectées par les propriétaires. En fonction de la cytologie du frottis, l'avancée du proœstrus pourra être estimée. Pour un début de proœstrus, un contrôle de frottis vaginal 5 jours plus tard est conseillé. Si le proœstrus est avancé, il est recommandé de réaliser un frottis vaginal deux jours plus tard pour apprécier la survenue de l'œstrus. Enfin, lorsque le frottis est évocateur d'un œstrus, le dosage de la progestérone devra être réalisé. La valeur de la progestéronémie déterminera alors la prise en charge.

1.3.1.1.2 Une méthode plus compliquée en pratique : l'échographie

Le suivi de stade ovarien est réalisé régulièrement au CERCA par échographie ovarienne, couplée au frottis et au dosage de progestérone. Cette méthode délicate a pour objectif d'estimer le stade ovarien. Les follicules pré-ovulatoires apparaissent à l'échographie sous la forme de structures rondes anéchogènes avec une fine paroi. Chez la chienne, la particularité de la lutéinisation pré-ovulatoire au cours de laquelle les parois folliculaires s'épaississent est difficilement interprétable par un utilisateur non habitué à l'échographie. Enfin, à l'ovulation les corps jaunes sont remplis d'un liquide et sont relativement similaires aux follicules pré-ovulatoires rendant l'interprétation délicate sans valeur de progestérone plasmatique associée (Fontbonne, 2008 ; Concannon, 2010).

Une étude a de plus montré que la précision d'une échographie ovarienne standard pour le suivi de chaleurs était moins efficace que l'échographie doppler des variations du débit de vascularisation ovarienne pour déterminer le pic de LH (Bergeron *et al.*, 2013).

Il est donc extrêmement rare pour un vétérinaire non spécialiste d'utiliser l'échographie Doppler en routine comme référence pour déterminer le stade de la chienne et il est de plus indispensable de la coupler avec un dosage de progestérone et des frottis vaginaux. Son utilisation reste cependant intéressante pour le dénombrement de follicules pouvant estimer grossièrement une taille de portée future (S. D. Johnston *et al.*, 2001).

1.3.1.2 Méthode de détermination de la date d'ovulation et délai de fertilité de la chienne

1.3.1.2.1 Dosage de progestérone et date d'ovulation

Le paramètre crucial à déterminer lors d'un suivi de chaleurs est la date d'ovulation. Nous avons vu précédemment que l'ovulation se produit au cours de l'œstrus, en moyenne 48h après le pic de LH (24 à 72 heures). Le pic de LH est accompagné de valeurs plasmatiques de progestérone atteignant en moyenne $2,7 \pm 0,6$ ng/ml (Hollinshead et Hanlon, 2019). La valeur moyenne du taux de progestérone sérique au moment de l'ovulation, est de $4,8 \pm 0,9$ ng/ml si on considère qu'elle a lieu 48 heures après le pic de LH et de $7,2 \pm 1,3$ ng/ml si on considère qu'elle a lieu 72 heures après. Ces valeurs sont établies par un analyseur d'Electrochimiluminescence Roche Modular E170 (Hollinshead et Hanlon, 2019). Il semblerait, toujours d'après les travaux d'Hollinshead et Hanlon établis sur plus de 1400 chiennes qu'il n'y ait pas de différences significatives dans les profils évolutifs de progestérone entre différents gabarits et différentes races.

Les valeurs de progestérone pouvant varier selon les analyseurs, les auteurs s'accordent pour dire que l'ovulation a eu lieu lorsque les valeurs de progestérone ont dépassé les valeurs seuils des appareils (généralement situées entre 5 ng/mL et 10 ng/mL) et ont augmenté de manière significative le lendemain (Fontbonne, 2008). La saillie ou l'insémination peuvent alors avoir lieu (Fontbonne, 1992).

1.3.1.2.2 Détermination du délai de fertilité

Lorsque l'on a déterminé le moment précis de l'ovulation chez la chienne, on sait pendant combien de temps elle est fertile selon la technique employée. Lors de saillie naturelle, la chienne est fertile avant l'ovulation jusqu'à 5 jours post-ovulation. En effet, le délai de maturation des ovocytes est de 2 à 3 jours après l'ovulation et ils restent ensuite viables trois à cinq jours. La survie des spermatozoïdes dans le vagin de la femelle étant de 6 jours minimum, la saillie peut être fécondante sur une plage de temps assez importante (Concannon *et al.*, 1983 ; Fontbonne, 2008).

La fermeture du col ayant lieu 5 jours après l'ovulation, elle empêche la fécondation lors d'insémination vaginale, mais il a été montré que l'insémination artificielle intra-utérine permet une fécondation jusqu'à 8 jours après ovulation. Les tailles de portée sont cependant diminuées après insémination au-delà de 6 jours post-ovulation, et les taux de résorption augmentent (Tsutsui *et al.*, 2009).

Des auteurs ont cherché à déterminer le moment optimal de fécondité par rapport au dosage de la progestérone. Une étude a constaté qu'un accouplement le lendemain du dépassement du taux de progestérone au-delà de 5 ng/ml donne une fertilité optimale. Lorsque la semence est congelée, d'autres auteurs ont montré que la fertilité est maximale six jours après le premier dépassement au-delà de 2 ng/ml en fin de proœstrus ou trois jours post-ovulation. Ces valeurs sont établies selon une méthode de dosage radio-immunologique et doivent être adaptées en fonction de l'analyseur utilisé (Okkens *et al.*, 2001 ; Steckler *et al.*, 2013 ; Maringue, 2015).

1.3.1.3 Méthode de détermination de la durée de gestation

1.3.1.3.1 Estimation de la durée de gestation par rapport à la saillie ou l'insémination

La durée de gestation basée sur la date de l'accouplement ou de l'insémination comme point de départ temporel peut varier de 56 jours à 68 jours (Concannon *et al.*, 1983). Cette grande diversité de valeurs peut s'expliquer par les deux facteurs vus précédemment : le premier est la durée de fertilité de la chienne très variable comme vue dans le paragraphe précédent pouvant aller jusqu'à 8 jours post-ovulation dans le cas d'insémination artificielle et le second est la durée de survie des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle allant jusqu'à 6 jours (Concannon *et al.*, 1983 ; Tsutsui *et al.*, 2009). De plus lors d'accouplement multiples, la durée de gestation peut varier de deux semaines selon si le décompte est réalisé à partir de la première saillie, ou de la dernière (Concannon, 2000).

Cette grande variabilité de la durée de gestation estimée à partir de l'accouplement ne permet donc pas une estimation fiable de la date de mise-bas. Cependant, il est important dans de nombreux cas d'avoir une planification fiable de la durée de la gestation pour diminuer les risques chez les brachycéphales, les gestations à risque (par exemple à chiot unique), ou chez les femelles ayant déjà présenté des difficultés à la mise-bas.

1.3.1.3.2 Calcul de la durée de gestation grâce au dosage de progestérone lors de la lutéinisation pré-ovulatoire

D'après certains auteurs, la date de parturition peut être estimée 65 jours \pm 1, 2 ou 3 jours après la date de l'augmentation de la progestérone lors de la lutéinisation pré-ovulatoire, estimée lorsque sa valeur est supérieure à 1,5 ng/ml. La probabilité que la parturition ait lieu à 65 jours \pm 1 est de 67%, de 90% à 65 jours \pm 2 et de 100% à 65 \pm 3 jours. Le format de la chienne ou la taille de la portée n'a pas d'influence sur l'estimation de la date (Kutzler, 2003).

Cependant un dosage unique ne peut faire office de certitude. Il faut s'assurer de la poursuite de l'augmentation de la P4 après le premier dosage montrant un dépassement de la valeur seuil de lutéinisation pré-ovulatoire. En effet il a été montré que des variations de la valeur de la progestérone ont lieu chez une même chienne au cours d'une même journée (Linde-Forsberg *et al.*, 2008). Enfin, les chiennes peuvent avoir différents types évolutifs de cycles, comme une montée pré-ovulatoire lente de la concentration de la progestérone, motivant la réalisation de plusieurs dosages pour conclure sur la survenue effective des événements ovariens (Fontbonne, 1992).

1.3.1.3.3 Calcul de la durée de gestation de la chienne à l'aide du dosage de la progestérone lors de l'ovulation

Des études ont calculé la durée moyenne de l'ovulation à la mise-bas chez la chienne. En se basant sur le jour de l'ovulation décrit comme celui où le dosage chimio-luminescent de la progestérone de 162 chiennes de race variable était supérieur à 6 ng/mL, une équipe française a pu calculer une durée moyenne de 63,1 \pm 2,1 jours (Mir *et al.*, 2011). Ces résultats sont confortés par une étude japonaise qui a montré une durée de gestation moyenne de 63,9 \pm 0,2 jours (Tsutsui *et al.*, 2006), dont les résultats variant par rapport à la première étude peuvent s'expliquer par un choix différent de la date d'ovulation. En effet cette seconde étude a choisi de prendre comme date d'ovulation le jour où les dosages de progestérone effectués sur une population de 36 chiennes Beagle étaient strictement supérieurs à 2 ng/ml avec un dosage enzymo-immunologique. Ces différences de protocoles peuvent expliquer les variations observées dans le calcul de la durée ovulation-parturition. On considère actuellement au CERCA que cette durée est de 63 \pm 2 jours en pratique.

Nous avons vu dans un paragraphe précédent que l'ovulation se produit en moyenne 48 heures après le pic de LH. Les études de Mir *et al.* et de Tsutsui *et al.* concordent donc avec des travaux précédents estimant la durée pic de LH-parturition à 65 \pm 1 jours (Concannon *et al.*, 1983).

1.3.1.4 Méthode de détermination de la date de parturition et de césarienne

1.3.1.4.1 Détermination de la date de parturition par le dosage de la progestérone

La première étape de la parturition correspond aux modifications comportementales de la chienne et à la dilatation du col utérin. Des comportements de nidation et de vocalisation de la chienne sont variablement observés, accompagnés d'une dilatation du col visible, liés à la première chute brutale de la progestérone de 5-10 ng/ml à 2-3 ng/ml. La seconde étape de la parturition, correspondant à l'expulsion des chiots une fois la dilatation cervicale achevée, se produit quant à elle lorsque la valeur de la progestérone a continué de diminuer en dessous de 2 ng/ml. La troisième et dernière étape de la parturition correspond à l'expulsion des placentas (Linde-Forsberg et Eneroth, 2000 ; Concannon, 2005 ; Smith, 2007).

Une étude récente a étudié la précision de la prédiction de la date de parturition de la chienne à partir d'une valeur unique de dosage de la progestérone plasmatique pendant la période pré-partum. Les auteurs ont ainsi comparé chez 25 chiennes la corrélation du niveau de progestérone plasmatique (mesurée par dosage radio-immunologique) à la survenue de la dilatation cervicale correspondant au stade 1 de la parturition chez 25 chiennes. Ils ont ainsi montré que lorsque la valeur de la progestérone est inférieure à 1 ng/ml (3,18 nmol/L dans l'étude), les chiennes ont 100% de chances d'atteindre le stade 2 de parturition dans les 24 heures. Elles ont également 99% de chances d'atteindre ce stade dans les 48 heures lorsque leur taux est de 2,74 ng/ml (8,7 nmol/L) (De Cramer et Nöthling, 2018).

À l'inverse, les chiennes à moins de 12 heures de déclencher le stade 1 de parturition ont respectivement 2% et 6% de chances d'avoir un taux de progestérone plasmatique au-dessus de 2,74 ng/ml (8,7 nmol/l) ou de 4,98 ng/ml (15,8 nmol/L) (De Cramer et Nöthling, 2018).

On considère en général en pratique qu'une chienne à terme doit mettre bas dans les 24 heures lorsque son taux de progestérone dosé sur un automate standard est inférieur à 2 ng/ml (Concannon, 2000).

1.3.1.4.2 Césarienne et dosage de progestérone

Une césarienne programmée peut être effectuée 2 à 2.5 jours avant le jour prévu de parturition basé sur la date d'ovulation chez les chiennes ayant reçu de l'aglépristone, soit à 61 jours post-ovulation. En effet, il a été montré que la dernière étape échographiquement observable de maturation fœtale survient entre 57 et 63 jours (Beccaglia *et al.*, 2016). L'aglépristone (ALIZINE® 10 mg/kg) injectée 15 à 20 heures avant la césarienne mime la chute de progestérone par son action anti-progestative.

Dans le cas où un suivi de chaleurs a été réalisé chez une chienne dont la mise-bas est à risque, il n'est ainsi pas obligatoire de doser la progestérone pour décider d'effectuer une césarienne programmée. Il a été montré que la réalisation de

césarienne programmée comporte beaucoup moins de risques de mortalité néonatale et pédiatrique que les césariennes réalisées en urgence sur des mise-bas dystociques. Il s'agit donc d'un excellent compromis pour les grossesses à risque, à condition qu'un suivi de chaleurs régulier soit effectué mais il soulève des problèmes éthiques dans plusieurs pays d'Europe (Concannon, 2000 ; Levy *et al.*, 2009 ; Roos *et al.*, 2018).

Lorsqu'aucun suivi de chaleurs n'a été effectué dans le cas d'une gestation sans anomalie, on peut alors effectuer une estimation de la date de parturition par échographie. On réalisera ensuite des dosages de progestérone quotidiens à partir du moment où l'on estime qu'il y a une probabilité de mise-bas. En fonction des appareils de dosage il faudra adapter la marche à suivre : si la valeur de la progestérone est en-dessous de la valeur seuil, la césarienne pourra être lancée. Si elle est au-dessus, on attend le dosage du lendemain.

1.3.1.5 Dosage de la progestérone chez une chienne normalement cyclée présentant des problèmes de fertilité

La réalisation de dosages de la progestérone est également indispensable dans des contextes diagnostiques d'infertilité chez des chiennes normalement cyclées en clinique vétérinaire. Une chienne cyclée peut présenter des problèmes d'infertilité se manifestant soit par une absence de fécondation, soit par des avortements ou résorptions.

Les causes possibles d'avortements ou de résorptions chez la chienne, (d'après Buff, 2001 ; et Blanchard, 2006) sont multiples :

- des causes infectieuses: virales (Herpèsvirus canin), bactériennes (*Brucella canis*) ou parasitaires, assez rares
- des causes nutritionnelles (carence en sodium, hypervitaminose A ou D)
- des affections de l'endomètre (hyperplasie kystique, endométrite)
- des causes iatrogènes (corticoïdes, chloramphénicol, intoxications...)
- d'autres causes endocriniennes (hypothyroïdie, **insuffisance lutéale** ...)
- des causes générales (mauvais état général, accident de la voie publique)

L'absence de fécondation est majoritairement liée à un mauvais choix de reproduction : échec de la date de mise à la reproduction, échec de saillie. Il arrive également que le mâle soit infertile et il faut contrôler sa fertilité avant de chercher une quelconque infertilité venant de la femelle. L'échec de la date de mise à la reproduction peut être lié à une augmentation plus lente que la normale de la progestérone avant l'ovulation qui fausse ainsi la date idéale de saillie ou d'insémination.

Le dosage de la progestéronémie prend toute son utilité dans un contexte de suspicion d'insuffisance lutéale ou d'augmentation lente de la progestéronémie avant l'ovulation.

1.3.1.5.1 Infertilité lors de suspicion d'insuffisance lutéale

1.3.1.5.1.1 La progestéronémie au cours de la gestation

Les concentrations de progestérone nécessaires pour permettre le maintien d'une gestation chez la chienne doivent être supérieures à des valeurs variables selon les auteurs : 1,9 ng/ml (Görlinger *et al.*, 2005), 2 ng/ml (Becher *et al.*, 2010), et 2,5 ng/ml (Johnson, 2008). Des concentrations plus faibles entraînent des résorptions ou des avortements (Becher *et al.*, 2010).

1.3.1.5.1.2 Définition de l'insuffisance lutéale et étiogénie

Un trouble hormonal pouvant aboutir à des avortements spontanés lors de gestation chez la chienne est l'insuffisance lutéale. L'insuffisance lutéale est définie comme une réduction de la durée de vie du corps jaune ou un arrêt prématuré de son fonctionnement entraînant une chute anormalement précoce de la concentration plasmatique de la progestérone. Chez la chienne, le corps jaune étant l'unique origine de synthèse de la progestérone, l'insuffisance lutéale peut se produire à n'importe quel moment de la gestation entraînant soit une infertilité, soit des résorptions (entre le 33^e et le 45^e jour) ou des avortements spontanés, assez rares. Elle se produit cependant généralement entre le 20^e et le 35^e jour de gestation (Blanchard, 2006 ; Becher *et al.*, 2010).

L'origine de cette affection est assez méconnue chez la chienne et certaines races grandes à géantes semblent prédisposées comme le Berger Allemand (Buff, 2001). Le corps jaune se formant à partir du follicule ovulatoire, la qualité du corps jaune dépend de la bonne maturation folliculaire. On suspectait initialement une possible origine par dérégulation des mécanismes de croissance folliculaire. Ces dérégulations de la croissance folliculaire pouvaient survenir soit au niveau hypothalamique, entraînant un défaut de synthèse de GnRH, et inhibant ainsi la synthèse de FSH et LH ; soit au niveau hypophysaire entraînant un défaut de synthèse de FSH (entraînant une mauvaise croissance du follicule), et de LH (entraînant une mauvaise lutéinisation) (Hanzen *et al.*, 1999 ; Blanchard, 2006).

Toutefois, une étude récente ne montre aucune diminution significative du taux de LH ou de FSH chez des chiennes gestantes insuffisantes lutéales (Tibold et Thuróczy, 2009), ce qui suggère que chez la chienne l'atteinte lutéale est vraisemblablement d'origine primaire ou liée à des taux anormaux de prolactine. Une hypoprolactinémie liée à une déficience en relaxine pourrait en être à l'origine par lutéolyse précoce du corps jaune (Johnson, 2008), mais également à l'inverse une hyperprolactinémie (Blanchard, 2006 ; Krachudel *et al.*, 2013). Le mécanisme d'infertilité lié à une hyperprolactinémie est expliqué chez la ratte : le taux élevé de prolactine fait baisser l'expression de kisspeptine dans les neurones à kisspeptine par le biais des récepteurs de la prolactine provoquant ainsi une baisse de relargage de GnRH. Cela induit une diminution de la sécrétion de LH et par conséquent de progestérone (Sonigo *et al.*, 2013).

D'autres hypothèses sont émises. Les infections ou inflammations de l'endomètre pourraient également être à l'origine d'une lutéolyse précoce par libération de prostaglandines (PGF2alpha) (Johnson, 2008). Enfin, des auteurs dans une étude

récente suspectent l'existence d'une réponse auto-immune avec des anticorps dirigés contre la progestérone chez la chienne (Krachudel *et al.*, 2013). Cette hypothèse reste encore cependant à confirmer.

1.3.1.5.1.3 Diagnostic d'une insuffisance lutéale et prise en charge médicale

Poser un diagnostic de certitude d'une insuffisance lutéale est difficile, puisqu'une diminution de la progestéronémie se produit physiologiquement lors de souffrance embryonnaire ou fœtale et est suivie d'une mise bas prématurée ou d'un avortement (Johnson, 2008).

Dans un premier temps il faut écarter toutes les autres causes d'avortement vues ci-dessus. Après avoir écarté les autres hypothèses, il est conseillé de réaliser des dosages hebdomadaires de progestérone dès la fin des chaleurs chez les chiennes dont on suspecte une insuffisance lutéale. La fréquence des dosages doit être augmentée lorsque la progestéronémie passe sous la valeur seuil de 10 ng/ml (31,4 nmol/L) (Becher *et al.*, 2010).

Si on détecte une diminution brutale de la progestéronémie entre le 20^e et le 35^e jour de gestation, c'est-à-dire une diminution supérieure à 10-15 ng/ml (31,4-47,1 nmol/L), ou si la valeur de la progestéronémie descend sous le seuil de 5 ng/ml (15,7 nmol/L) avant le 58/60^e jour de gestation, on recommande en France et en Allemagne de compléter la chienne en progestérone naturelle (UTROGESTAN®) jusqu'à 2 à 3 jours avant la date prévue de parturition (Becher *et al.*, 2010).

1.3.1.5.2 Augmentation retardée de la progestéronémie

1.3.1.5.2.1 La progestéronémie avant le pic de LH : rappels

Pour rappel, la lutéinisation pré-ovulatoire débute chez la chienne par une augmentation modérée de la concentration de progestérone en fin de proœstrus jusqu'à 6 jours avant le pic de LH. La concentration de progestérone croît progressivement d'un niveau basal en début de proœstrus (de 0,2 à 0,4 ng/mL) à un niveau plus élevé (entre 1,0 ng/mL et $2,7 \pm 0,6$ ng/ml selon les auteurs) au moment du pic de LH. Cette hausse de concentration est nécessaire pour que le pic de LH soit déclenché par rétrocontrôle positif. Au cours du pic de LH, la concentration de progestérone augmente très rapidement à des niveaux élevés de 5 jusqu'à 10 ng/mL au moment de l'ovulation (Concannon, 1977 ; Kowalewski, 2018 ; Hollinshead et Hanlon, 2019).

1.3.1.5.2.2 Définition de l'augmentation lente de la progestéronémie et étiogénie

En temps normal, la progestérone met en moyenne 48 heures à croître de 2 ng/ml au moment du pic de LH jusqu'à 10 ng/ml. Chez certaines chiennes en proœstrus, il arrive que la progestéronémie stagne à une valeur plateau inférieure à 2 ng/ml pendant trois à sept jours (Romagnoli et Lopate, 2017). Certaines présentent même un plateau de progestéronémie entre 2 à 6 ng/ml pendant plus de quatre jours (Baron, 2006). On observera dans ces cas une ovulation uniquement lorsque la

progestéronémie augmentera finalement au-delà des valeurs seuils donc au-delà de 10 ng/ml (Romagnoli et Lopate, 2017).

L'étiologie est assez méconnue : on suspecte soit un déficit en œstrogènes circulants ne stimulant pas assez le relargage de GnRH, soit un déficit en LH pour induire l'ovulation, soit une réponse retardée des follicules après leur stimulation par la LH. Il est donc suspecté un pic de LH retardé, survenant lorsque la progestérone atteint des valeurs plus élevées que d'ordinaire, au-delà des 3 à 4 ng/ml (Romagnoli et Lopate, 2017).

1.3.1.5.2.3 Diagnostic biologique d'une augmentation lente de progestéronémie et prise en charge

Concernant l'augmentation lente de la progestéronémie, la chienne est bien cyclée et ovule mais le retard d'ovulation par rapport aux autres cycles peut conduire à des échecs de saillie ou d'insémination si la progestéronémie n'est pas bien contrôlée. Ainsi, il est recommandé de doser très fréquemment la progestéronémie chez les chiennes chez qui ce retard d'augmentation est suspectée, jusqu'à obtenir une valeur de 10 ng/ml. Il est également déconseillé d'utiliser de la semence congelée ou réfrigérée dans ce cas car les taux de fertilité sont aléatoires (Romagnoli et Lopate, 2017).

1.3.2 Applications du dosage de la progestérone dans un cycle anormal

Nous avons vu les différentes applications du dosage de la progestérone dans le cas d'un suivi de reproduction chez des chiennes possédant des cycles normaux. Certaines chiennes sont anormalement cyclées et ces anomalies génèrent de nombreux échecs de mise à la reproduction. Nous allons voir dans quels contextes un dosage de progestérone est utile pour le diagnostic et la gestion de cycles anormaux.

1.3.2.1 Application du dosage de la progestérone chez une chienne présentant une durée d'interœstrus courte

On considère que la durée interœstrale est anormale et écourtée chez la chienne lorsqu'elle est inférieure à 5 mois environ. Cette durée varie selon les auteurs. Il est fréquent que les chiennes à interœstrus court présentent des problèmes de fertilité associés. Il faut distinguer deux cas. Le premier cas où la femelle ovule. Le second cas où la durée des chaleurs est impactée et qu'aucune ovulation n'a lieu (Feldman et Nelson, 2004b).

Ainsi, lorsqu'une femelle destinée à la reproduction est présentée pour troubles de la fertilité dans un contexte de délai interœstral court, le premier réflexe est de doser la progestérone sérique à la fin des chaleurs pour s'assurer que l'ovulation a bien eu lieu, permettant d'orienter les hypothèses diagnostiques. Nous verrons dans un premier temps quels sont les différentes hypothèses diagnostiques lors d'interœstrus court lors de cycles ovulatoires, puis dans un second temps les hypothèses diagnostiques lors d'interœstrus court et de cycles anovulatoires.

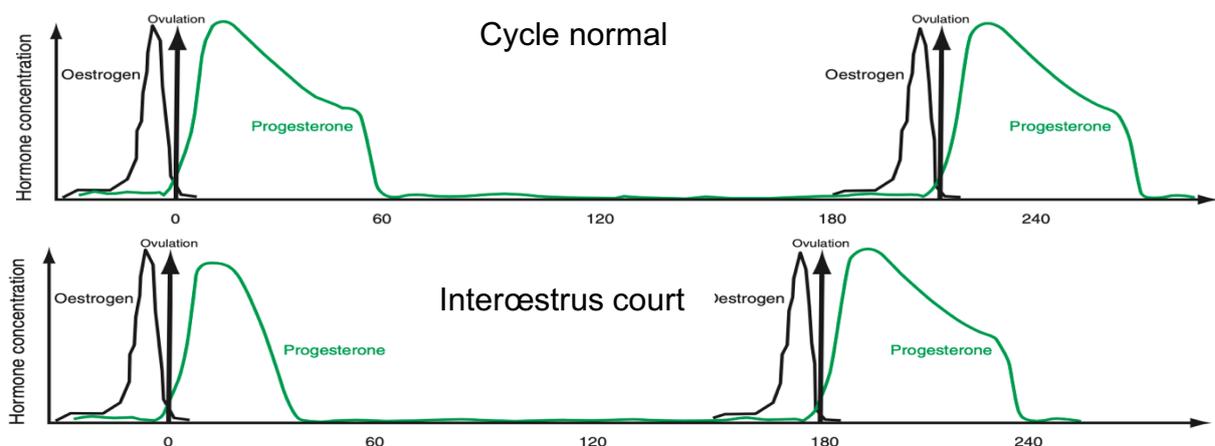
1.3.2.1.1 Interoestrus court suivi d'une ovulation après les chaleurs chez la chienne

Certaines races sont prédisposées à présenter des intervalles interœstraux courts. On compte parmi celles-ci les Bergers Allemands, Rottweiler, Akita, Labrador Retriever, Cocker et les Basset Hound (Romagnoli et Lopate, 2017). De plus, il existe également des variations individuelles de cycle chez les chiennes pouvant conduire à l'observation de délais courts. Dans le cas où les chiennes ont ovulé à la suite des chaleurs, les causes conduisant à la diminution de l'intervalle interœstral sont inconnues. Il est suggéré qu'une élévation du taux de progestérone doit atteindre une certaine amplitude et doit durer assez longtemps pour que l'axe hypothalamo-hypophysaire détecte le cycle et déclenche un anœstrus de durée suffisante, c'est-à-dire de 3 mois (Romagnoli et Lopate, 2017). Si l'amplitude et la durée de l'augmentation de la concentration de progestérone sérique est trop faible, des auteurs suggèrent que cela pourrait entraîner un raccourcissement de l'anœstrus (Meyers-Wallen, 2007 ; Romagnoli et Lopate, 2017).

Ainsi, une étude a comparé les concentrations sériques de progestérone chez des femelles non gestantes, à cycle normal, ou à cycle anormalement court (<5 mois). Il a été montré que la quantité de progestérone sérique dosée par l'Immulite était significativement plus faible chez les femelles à cycle court. Il semblerait donc que l'activité lutéale soit diminuée chez ces chiennes avec l'existence d'une insuffisance lutéale associée (Günzel-Apel *et al.*, 2006), renforçant l'hypothèse énoncée ci-dessus.

La figure 15 ci-dessous montre la différence d'évolution de la progestérone au cours d'un cycle normal et au cours d'un cycle présentant une durée d'interœstrus courte (England, 2010). L'infertilité découlant de cet intervalle court serait due à un manque de repos de l'endomètre au cours de l'anœstrus. Les anglo-saxons appellent ce phénomène le « *short anœstrus syndrome* » (Romagnoli et Lopate, 2017).

Figure 15 : Evolution de la progestérone dans un cycle normal et un cycle avec durée d'interœstrus courte, (England, 2010)



On voit que l'intervalle interœstrus dans le second cycle est raccourci. En effet, la progestéronémie diminue plus rapidement que dans le cycle normal pouvant conduire à une diminution de la durée de l'anœstrus, comme il est suspecté à ce jour.

1.3.2.1.2 Interœstrus court sans ovulation après les chaleurs chez la chienne

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que le dosage de la progestérone est essentiel dans le cas d'une exploration d'infertilité liée à un interœstrus court pour déterminer si la chienne a ovulé après les chaleurs observées. Dans le cas où la chienne n'a pas ovulé, on distingue trois possibilités : soit la chienne présente des cycles anovulatoires, dans le cas de chaleurs disjointes par exemple, mais il existe des cycles anovulatoires purs (Arbeiter, 1993), soit la présence d'un hyperœstrogénisme par la présence de kystes folliculaires ou de tumeurs ovariennes (tumeurs des cellules de la granulosa) empêchant l'ovulation, soit la progestérone croît lentement. Il est intéressant de doser la progestérone pour différencier plusieurs cas de figures et permettre d'établir un pronostic concernant la fertilité.

1.3.2.2 Interœstrus court dans le cas des chaleurs disjointes ou « fausses chaleurs »

Le cas des fausses chaleurs est assez particulier car l'intervalle interœstral n'est pas véritablement raccourci. En effet, les chaleurs disjointes sont définies comme une succession de deux à trois cycles de développement folliculaire accompagnée de signes de proœstrus sans augmentation de la quantité sérique de progestérone associée.

Ces premiers cycles de développements folliculaires sont ensuite suivis par la régression des follicules semblant mimer une phase de dioœstrus pour les propriétaires. Dans 50 % des cas, les chiennes présentent finalement un cycle ovulatoire au bout de trois mois. Il est ainsi intéressant de doser la progestérone qui ne croît jamais au-dessus de 3.5 à 6 ng/ml pour poser le diagnostic de chaleurs disjointes (Feldman et Nelson, 2004b ; Fontbonne, 2011 ; Romagnoli et Lopate, 2017).

Les fausses chaleurs se manifestent plus fréquemment chez des jeunes chiennes mais ont une incidence très faible (<1%), et n'ont pas d'influence sur la fertilité future des chiennes. Les chaleurs disjointes auraient également une incidence plus élevée chez les chiennes présentant un interœstrus court (<3 mois). Il est conseillé de ne pas traiter les chiennes contre les chaleurs disjointes et d'attendre la régulation hormonale avec l'âge. Le cycle rentre dans l'ordre généralement avant les trois ans de la chienne (Feldman et Nelson, 2004b ; Fontbonne, 2011 ; Romagnoli et Lopate, 2017).

1.3.2.3 Application du dosage de la progestérone chez une chienne présentant une durée d'interœstrus longue (supérieure à 10 mois)

1.3.2.3.1 Dosage de la progestérone dans le cas d'un anœstrus prolongé

1.3.2.3.1.1 Différentiation entre anœstrus vrai et chaleurs silencieuses

Lorsqu'une chienne est présentée pour anœstrus, le vétérinaire doit dans un premier temps faire la différence entre anœstrus vrai et chaleurs silencieuses. Les chaleurs silencieuses sont définies comme la présence d'une activité ovarienne sans manifestation extérieure de chaleurs (pertes sanguines, œdème vulvaire, attraction

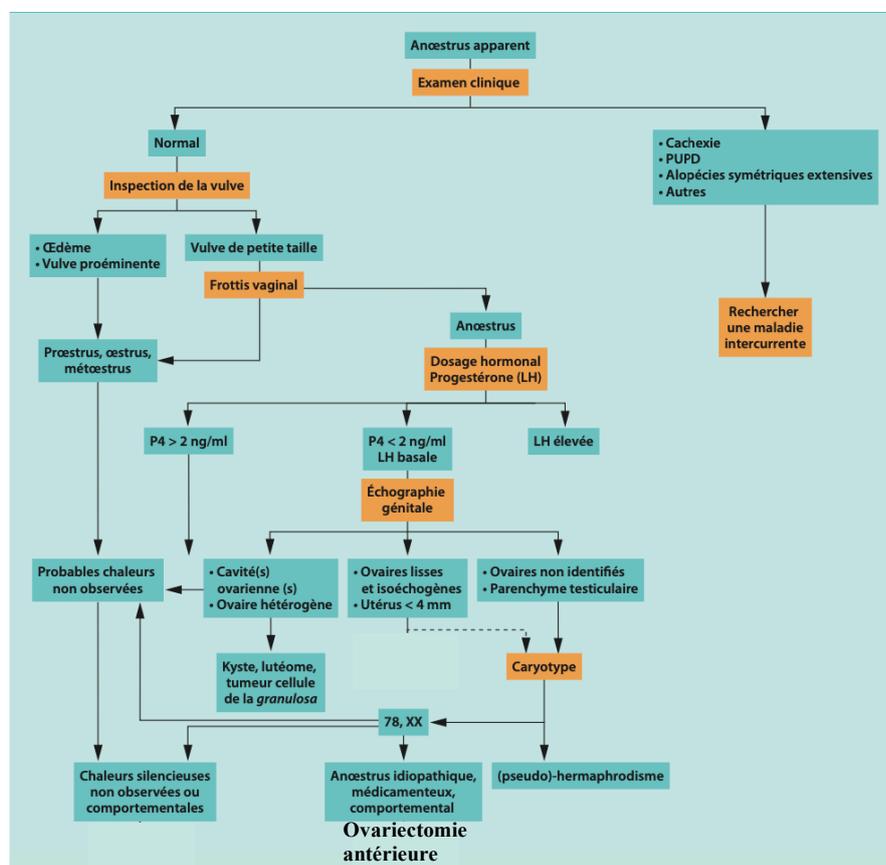
des mâles) (Thébault, 2006 ; Lévy, 2011). La chienne présente alors un cycle d'anœstrus apparent. Cependant, il est fréquent que des propriétaires ne remarquent pas les signes de chaleurs discrets.

Le diagnostic différentiel de l'anœstrus apparent comporte (Lévy, 2011) :

- L'anœstrus médicamenteux (glucocorticoïdes, progestagènes, antimycosiques)
- L'anœstrus comportemental (stress en chenil, inhibition au contact d'autres femelles)
- L'anœstrus idiopathique
- L'anœstrus secondaire à une maladie intercurrente.
- L'agénésie ou aplasie ovarienne
- L'ovarite à médiation immune
- Une ovariectomie préalable non connue du propriétaire
- Un pseudohermaphrodisme ou un caryotype anormal (très rare)
- Les chaleurs silencieuses

La figure 16 ci-dessous répertorie la marche à suivre lorsqu'un vétérinaire est confronté à un anœstrus apparent. Lorsque le vétérinaire a constaté l'existence d'un anœstrus primaire ou l'existence de chaleurs non observées à l'aide d'un examen clinique et d'un frottis vaginal, le dosage de la progestérone associé à l'échographie génitale est indispensable dans la démarche diagnostique.

Figure 16 : Arbre décisionnel lors d'anœstrus apparent d'une chienne (modifié, d'après Lévy, 2011)



Ainsi il est conseillé lors d'anœstrus apparent de rechercher dans un premier temps une maladie intercurrente si l'examen général le fait suspecter. Dans un second temps de réaliser une inspection de la vulve et de réaliser un frottis vaginal pour vérifier si les chaleurs n'ont simplement pas été non observées par les propriétaires. Enfin, lorsque ces hypothèses ont été écartées, il convient de rechercher par dosage hormonal, échographie génitale ou plus rarement en dernière intention par caryotype d'autres causes.

1.3.2.3.1.2 Dosage de progestérone dans le cas de chaleurs silencieuses

Lorsque la concentration de la progestérone est supérieure à 2 ng/ml, il s'agit probablement de chaleurs silencieuses. D'autres causes comme des kystes ovariens lutéaux ou des tumeurs ovariennes sont à écarter à l'aide de l'échographie génitale. Si l'échographie génitale est sans anomalie, le diagnostic de chaleurs silencieuses est un diagnostic de certitude lorsque la valeur de la progestérone est supérieure à 10 ng/ml. Il est recommandé de doser la progestérone une fois par mois pour s'assurer que l'ovulation a eu lieu sans être détectée par le propriétaire. Aussitôt que des valeurs de progestéronémie élevée sont détectées, le vétérinaire pourra informer le propriétaire que la chienne est à surveiller dans les 4 à 6 mois suivant pour vérifier la survenue des prochaines chaleurs (Lévy, 2011 ; Wilborn et Maxwell, 2012).

1.3.2.3.1.3 Dosage de progestérone dans le cas d'anœstrus vrai

Lorsque la concentration de la progestérone est inférieure à 1 ng/ml, il s'agit d'un anœstrus vrai (Lévy, 2011). Dans ce cas, l'échographie génitale pourra aider à poser le diagnostic (voir la figure 15 ci-dessus).

1.3.2.3.2 Dosage de la progestérone dans le cas d'un diœstrus prolongé

La durée de l'intervalle interœstral peut également être allongée à cause d'un diœstrus prolongé. Le diœstrus prolongé est provoqué par une progestéronémie haute et la chienne ne présente aucun signe clinique particulier. Le diagnostic différentiel du diœstrus prolongé comporte les kystes lutéaux sécrétant de la progestérone et les lutéomes ou les tumeurs des cellules de la granulosa sécrétant de la progestérone.

Le diagnostic de certitude est établi par des dosages de la progestéronémie devant être supérieurs à 2 plus de 9 semaines (65 jours) et la réalisation d'une échographie ovarienne. On recommande de doser deux fois la progestéronémie entre 4 et 6 semaines d'intervalle pour établir le diagnostic d'un diœstrus prolongé. Une échographie ovarienne permet d'observer les kystes lutéaux mais il est difficile de faire la différence avec des corps jaunes. Le traitement préconisé est soit l'ovariectomie en présence de tumeurs, soit un traitement par l'administration de PGF2 alpha (Fontbonne, 2011).

Nous avons vu dans cette première partie que la progestérone était une hormone clé du cycle sexuel de la chienne et que son dosage avait de nombreuses applications pour la maîtrise de la reproduction. Il existe différentes manières de doser la progestérone et chaque technique possède ses propres avantages et limites. Nous avons répertorié dans cette seconde partie les différents types de dosage de la progestérone à usage vétérinaire pour en apprécier les caractéristiques spécifiques.

2 Les différentes techniques pour doser la progestérone

Les immuno-dosages ont été les premières techniques utilisées pour doser la progestérone (Béné *et al.*, 2014).

L'immuno-analyse est basée sur la formation de complexes immuns *in vitro*. La plupart des techniques d'immuno-analyse courantes utilisent un marquage pour révéler et quantifier la réaction Antigène-Anticorps (Ag-Ac). Ces techniques présentent une sensibilité, une spécificité, et une fiabilité toutes supérieures aux techniques sans marquage. Un marqueur est une entité (atome, molécule, ion...) liée chimiquement à un Ag ou Ac, et délivrant un signal direct ou indirect, quantitativement mesurable. L'élément marqué est appelé le conjugué (Béné *et al.*, 2014).

La masse de la progestérone étant faible, seules des méthodes d'immuno-dosage dites « par compétition » sont possibles. En effet, sa petite taille et sa concentration faible en font un réactif en quantité limitée. Un dosage non compétitif ne se réalisant que par excès de l'antigène serait donc trop imprécis. La progestérone à doser entre en compétition avec une progestérone conjuguée à un marqueur pour se lier à un anticorps utilisé en quantité restreinte. Les méthodes de quantification diffèrent ensuite selon la nature du signal émis par le traceur utilisé : radioactif, colorimétrique, fluorescent ou luminescent. En fonction de la précision de l'analyse demandée, le test choisi sera quantitatif ou semi-quantitatif (Patrono et Peskar, 1987 ; Béné *et al.*, 2014).

De nouvelles méthodes introduites sur le marché plus tardivement permettent de nos jours de doser la progestérone, avec des techniques complexes n'utilisant plus les marqueurs immunologiques (spectrométrie de masse couplée à la chromatographie).

2.1 Techniques d'analyses immunologiques quantitatives

Les techniques quantitatives permettent de chiffrer la concentration d'une molécule avec le plus de précision possible. Il en existe plusieurs, plus ou moins récentes, permettant de doser la progestérone chez la chienne : les dosages radio-immunologiques, les dosages immuno-enzymatiques, les dosages par spectrométrie couplée à la chromatographie et enfin les dosages par résonance plasmonique couplée à de la fluorescence. Nous allons décrire les différentes possibilités de doser la progestérone à l'aide d'une immuno-analyse.

2.1.1 Le dosage radio-immunologique ou RIA

Le dosage radio-immunologique ou RIA (radioimmunoassay) est la méthode de dosage immunologique la plus ancienne et la plus fiable pour doser les hormones stéroïdiennes. Il a été développé par le Pr. Rosalyn Yalow qui a même obtenu le prix Nobel pour ses travaux en 1977. Cette méthode permet de mesurer des concentrations infimes jusqu'au picogramme. La première hormone étudiée pour le développement de cette technique est l'insuline en 1959, puis cette méthode de dosage a été élargie à des hormones stéroïdiennes par la suite (Berson et Yalow, 1959).

Il est considéré comme la première technique de référence pour le dosage de la progestérone chez la chienne depuis l'homologation de ce type dosage pour cette espèce en 1986 (Srikandakumar *et al.*, 1986).

2.1.1.1 Principe

2.1.1.1.1 Constituants et compétition (Patrono et Peskar, 1987 ; Hannon *et al.*, 2004)

Le dosage radio-immunologique est un dosage par compétition, c'est-à-dire que l'anticorps devant se lier à l'antigène dont on cherche la concentration sera introduit en quantité limitée. Dans notre cas, l'antigène correspond à l'hormone que nous souhaitons doser.

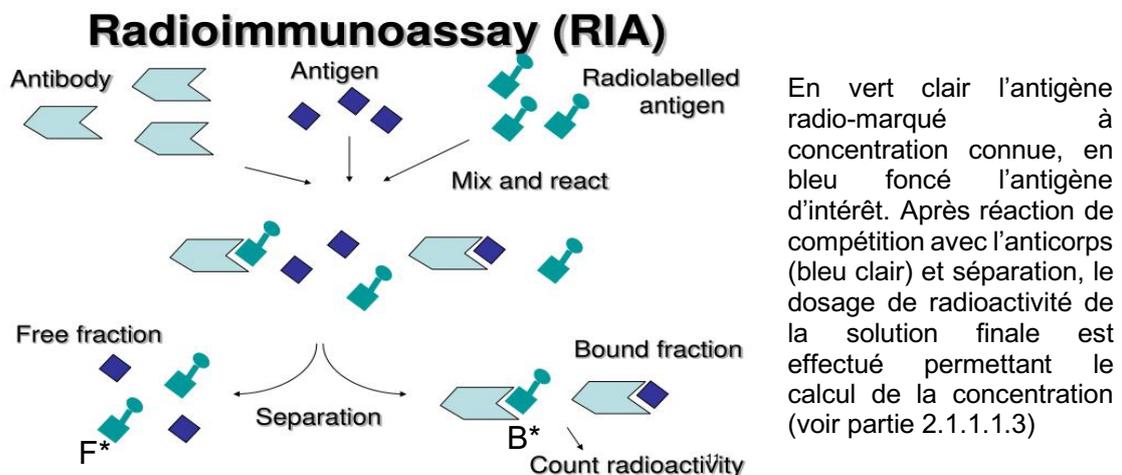
Il n'est pas nécessaire que l'antigène marqué et l'antigène non marqué soient identiques sur le plan chimique ou biologique, ils doivent juste entrer en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps. Le radio-marquage est la plupart du temps effectuée grâce à l'iode 125, ou encore au tritium.

Dans un premier temps, on introduit dans une solution de concentration connue d'Ac spécifique à l'hormone H qu'on désire doser, un antigène radio-marqué B en quantité connue (ayant des sites de liaison avec l'Ac) et la solution contenant l'hormone de concentration inconnue H^T. La quantité d'Ac introduit doit être inférieure à la quantité d'antigène marqué B pour que les deux antigènes entrent en compétition pour les sites de liaison à l'anticorps. Les complexes immuns vont s'assembler et chaque site de liaison des Ac sera lié soit aux B soit à l'hormone de concentration inconnue H^T (Patrono et Peskar, 1987 ; Hannon *et al.*, 2004).

Il y aura dans la solution une fraction libre correspondant aux antigènes B marqués et d'une partie de H^T, qui n'ont pas pu se fixer aux Ac. On appellera F* la fraction des antigènes marqués libres.

La fraction liée correspond aux antigènes B marqués et d'une partie de H^T, qui sont fixés sur les Ac. On appellera B* la fraction marquée liée. La figure 17 ci-dessous schématise les interactions lors du dosage.

Figure 17 : Principe simplifié du dosage radio-immunologique, (<http://www.biosciencenotes.com/radioimmunoassay-ria/>, 2018)



2.1.1.1.2 Séparation

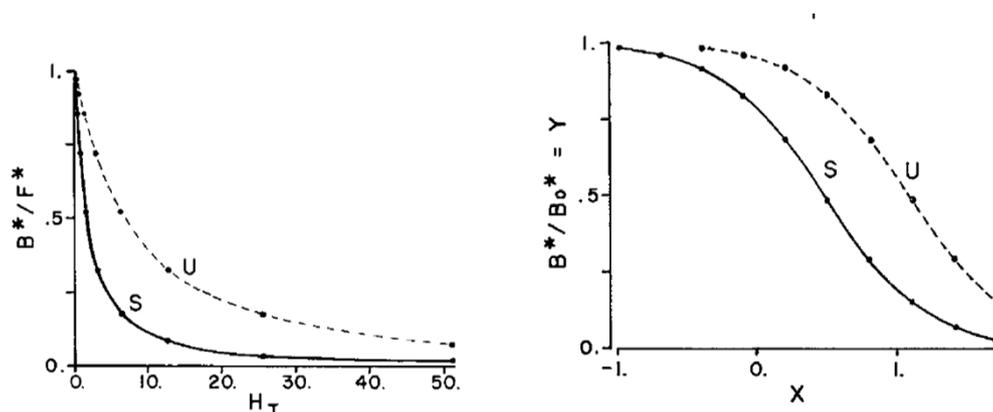
Après que l'interaction des réactifs chimiques s'est produite, on réalise une séparation de la fraction libre et de la fraction liée. La séparation peut être réalisée par précipitation des complexes immuns, par adsorption du marqueur libre ou par lavage de la phase solide. On utilise le plus souvent la technique du double anticorps combiné à du polyéthylène (Patrono et Peskar, 1987 ; Hannon *et al.*, 2004).

Elle correspond à la phase critique pour la précision des mesures.

2.1.1.1.3 Détermination de la concentration

La radioactivité est généralement mesurée sous forme de comptage par minute (CPM), à l'aide d'un compteur à scintillation gamma ou bêta et au moins 100 comptages pour une mesure doivent être réalisés pour éviter l'imprécision due aux erreurs de comptage. Une courbe d'étalonnage ou standard est générée simultanément à partir d'échantillons témoins marqués dont les concentrations sont connues et variables. Il existe différentes manières d'établir les courbes standard, qui sont au choix du scientifique. On peut voir sur la figure 18 suivante deux manières de réaliser des courbes standards en fonction du rapport entre fraction liée et fraction libre B^*/F^* (voir graphique de gauche de la Figure 18), ou encore du rapport de radioactivité entre fraction liée B^* et la fraction liée B_0^* (voir graphique de droite de la Figure 18). B_0^* correspond au témoin négatif c'est-à-dire la fraction témoin d'antigène marquée liée aux anticorps en l'absence de l'échantillon H^T (Midgley *et al.*, 1969 ; Patrono et Peskar, 1987 ; Hannon *et al.*, 2004).

Figure 18 : Exemple de réalisation de courbes standard en RIA (Midgley *et al.*, 1969)



Pour déterminer la concentration, on se rapporte à la courbe standard S. On calcule le rapport de radioactivité entre fraction liée et fraction libre le plus souvent (graphique à gauche). Puis on rapporte en ordonnée notre valeur et on obtient par intersection avec la courbe S la valeur en abscisse correspondant à la concentration cherchée. X correspond au logarithme de H_T qui est la concentration de l'échantillon en antigène d'intérêt.

2.1.1.2 Avantages

2.1.1.2.1 Sensibilité

La sensibilité analytique d'un test immunologique quantitatif est définie comme la plus petite quantité d'antigène non marqué pouvant être distinguée de manière significative de l'absence totale de composé. La liaison antigène-anticorps est caractérisée par une liaison de haute énergie ce qui permet la formation du complexe immun même lors de faibles concentrations des constituants. De plus, pour que les quantités infimes d'antigène non marqué soient quantifiées, il faut que l'antigène marqué soit détectable. L'iode radio-marquée I125, lorsqu'elle est liée à une molécule est facilement détectable par un compteur gamma, garantissant la quantification de la concentration en antigène non marqué. C'est la forte affinité de l'anticorps pour son antigène, ainsi que les caractéristiques du traceur radioactif qui permettent de garantir l'excellente sensibilité du test RIA (Patrono et Peskar, 1987).

2.1.1.2.2 Spécificité

La spécificité analytique d'un test immunologique quantitatif est définie comme l'absence d'interférences de substances autres que la molécule à doser. Elle dépend donc de la capacité des immunoglobulines à reconnaître une structure moléculaire donnée sans influence d'autres paramètres (dilution, pH, réactions croisées avec d'autres molécules...). En ce qui concerne la RIA, les variations de spécificité sont étroitement liées au milieu de l'échantillon, que ce soit le pH ou l'équilibre électrochimique (Patrono et Peskar, 1987).

En effet, on sait que certaines substances n'ont pas la même conformation selon le pH du milieu par réaction acido-basique comme les métabolites de la prostaglandine par exemple. Ceci peut avoir pour effet de modifier leur liaison antigène-anticorps. De même, la teneur en sel du liquide biologique dont on dose la concentration en hormone par exemple peut modifier artificiellement la concentration. Ces deux paramètres peuvent être maîtrisés puisque la sensibilité du test RIA permet une bonne dilution. De manière générale, la sensibilité est tellement haute, que la spécificité du test reste excellente (Patrono et Peskar, 1987).

2.1.1.3 Inconvénients

2.1.1.3.1 Durée de vie courte du RIA

Le kit d'utilisation de RIA a une durée de vie courte et définie. En effet, l'activité de l'isotope radioactif diminue progressivement à mesure qu'il se désintègre. Le taux de désintégration est spécifique à l'isotope. L'iode 125, couramment utilisée pour les tests, a une demi-vie de 60 jours. Étant donné que la dénaturation peut altérer l'immunoréactivité des analytes, en particulier pour les protéines, les réactifs radiomarqués ne doivent pas être utilisés au-delà de leur date de péremption, même s'ils fournissent encore des taux de CPM adéquats (Hannon *et al.*, 2004).

2.1.1.3.2 Règlements de la radioactivité

Les dosages radio-immunologiques ne peuvent être utilisés que dans des établissements agréés ayant l'autorisation de manipuler des radio-isotopes. La détention et l'utilisation de radio-isotopes sont soumises à une autorisation préalable délivrée par l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN). Les matières radioactives ne peuvent être reçues, acquises et utilisées que par des laboratoires agréés. Les réglementations relatives à la radioprotection doivent être respectées et sont donc régulièrement contrôlées (Aubert *et al.*, 2009).

2.1.1.3.3 Gestion du stockage et des déchets

Les réactifs radio-marqués doivent être stockés selon les spécifications du fabricant et selon les recommandations de l'ASN et ils doivent être manipulés et éliminés conformément aux directives réglementaires nationales et régionales relatives à l'utilisation des radio-isotopes (Aubert *et al.*, 2009).

2.1.1.3.4 Interférences

La précision du dosage RIA peut être diminuée par la présence de certains composants sanguins comme la bilirubine, l'hémoglobine, ou encore les lipoprotéines. Ainsi des interférences peuvent survenir dans un sérum ictérique, hémolysé ou lipémique (Béné *et al.*, 2014).

Nous avons décrit le premier dosage de référence pour la détermination de la concentration de la progestérone chez la chienne, correspondant à la technique RIA. Elle présente plusieurs inconvénients, dont une limite majeure correspondant à l'utilisation de matériel radio-actifs. D'autres techniques faisant intervenir une réaction enzymatique pour révéler les complexes anticorps-antigènes ont été développées, ne nécessitant pas de manipulation de réactifs radio-actifs. Il s'agit des techniques immuno-enzymatiques, que nous allons décrire dans la partie suivante.

2.1.2 Les dosages immuno-enzymatiques ou EIA

Il existe de nombreux types de dosages immuno-enzymatiques (*Enzymatic Immunoassay* ou EIA) différents, mais ils impliquent tous au moins une molécule d'anticorps conjugué à une enzyme, et à son antigène spécifique. L'ajout d'un substrat pour l'enzyme permet de visualiser ou de quantifier l'antigène. Le substrat de l'enzyme est le plus souvent un chromogène, une molécule incolore qui est convertie en un produit final coloré par réaction enzymatique. Le dosage est alors colorimétrique.

Dans certains EIA, le substrat est un fluorogène, une molécule non fluorescente que l'enzyme convertit en une forme fluorescente. Ces dosages sont appelés immuno-dosages fluorescents par enzyme liée (ELFA) ou dosages fluoro-enzymo-immunologiques (FEIA). La fluorescence peut être détectée soit par un microscope à fluorescence, soit par un spectrophotomètre. L'intensité du signal dépend de la quantité d'enzyme présente, qui, dans un test compétitif, est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène dans l'échantillon original (Hannon *et al.*, 2004).

Le dosage d'immuno-absorption par enzyme liée ou ELISA est le dosage immuno-enzymatique le plus utilisé. La technique nécessite un ou deux anticorps. Lorsqu'il est unique, l'anticorps a une fonction de capture et de détection. Lorsqu'il y en a plusieurs, un des anticorps a une fonction de capture et le second est un anticorps de détection. Le dosage ELISA a été mis au point par Engvall et Perlmann en 1971 (Engvall et Perlmann, 1971). Le dosage ELISA et le dosage FEIA sont des dosages utilisés pour quantifier la progestérone chez la chienne. Ce sont des immuno-dosages hétérogènes, tout comme la RIA, car ils nécessitent des étapes de séparation des composants avec marqueurs (Porstmann et Kiessig, 1992).

2.1.2.1 Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée : ELISA

Le dosage ELISA sur plasma est homologué pour l'étude de la progestéronémie chez la chienne depuis 1989 (England *et al.*, 1989).

Il existe quatre techniques principales différentes pour réaliser un dosage enzymatique ELISA : la technique ELISA directe, ELISA indirecte, ELISA sandwich et ELISA par compétition. Pour ces quatre méthodes, la quantification est réalisée par mesure de l'absorbance de la solution qui est corrélée à la concentration de la solution en antigène d'intérêt (Grange *et al.*, 2014). Nous allons brièvement expliquer les différences entre ces quatre techniques.

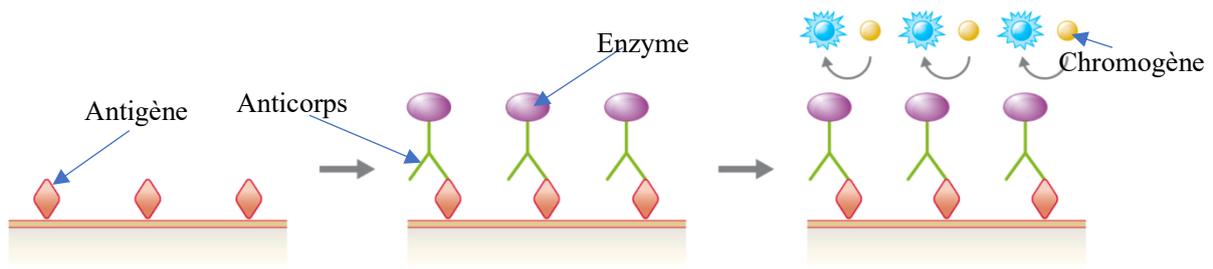
2.1.2.1.1 ELISA direct

2.1.2.1.1.1 Description

La technique ELISA directe est la plus simple des techniques ELISA. L'échantillon contenant l'antigène dont on cherche à doser la concentration est absorbé sur la surface du puit d'une microplaque. Le puit est lavé, et on y ajoute un anticorps, complémentaire de l'antigène, sur lequel est fixée une enzyme. Il se fixe à l'antigène sur ses sites spécifiques. Le puits est à nouveau lavé pour ne laisser que le complexe immun antigène-anticorps lié à sa surface. Un substrat chromogène est ensuite ajouté, qui sera converti par l'enzyme en un chromophore pour colorer la solution. Au bout du temps imparti préconisé par le fabricant, on ajoute un agent bloquant pour stopper la réaction chimique, dans le but de ne plus altérer la couleur de l'échantillon. L'absorbance de la solution sera détectable par spectrophotométrie, et sa valeur sera calculée par rapport à une courbe standard d'échantillonnage préalablement réalisée. On en déduit alors comme pour le dosage RIA la concentration de l'antigène d'intérêt (Grange *et al.*, 2014).

La figure 19 suivante schématise le processus d'ELISA direct.

Figure 19 : Mécanisme de l'ELISA direct, (modifié d'après Parker et al 2016)



Ici, la réaction de révélation correspond à la coloration de la solution en bleue par le chromogène activé par l'enzyme en chromophore. L'absorbance mesurée permettra la mesure de la concentration en antigène d'intérêt.

2.1.2.1.1.2 Particularités

Cette méthode a l'avantage d'être plus rapide et plus simple que les autres méthodes ELISA. En effet, elle contient moins d'étapes et un seul anticorps. Elle présente toutefois certaines limites. Dans les échantillons complexes, contenant plusieurs molécules autres que l'antigène d'intérêt, certaines molécules seront adsorbées sur le puits. Cela s'avère problématique lorsque l'antigène d'intérêt est en faible abondance, car la sensibilité du test est réduite. En outre, la conjugaison de l'anticorps avec une enzyme peut réduire l'affinité de l'anticorps pour son antigène spécifique.

Un autre problème est que l'anticorps spécifique de l'antigène doit être également lié à une enzyme spécifique et adaptée, dont le procédé industriel est coûteux et long. Les autres méthodes ELISA permettent d'éviter ce problème car le même anticorps de détection est utilisé à grande échelle pour le dosage de nombreuses molécules différentes (Grange *et al.*, 2014).

2.1.2.1.2 ELISA indirect

2.1.2.1.2.1 Description

Dans cette technique, l'échantillon contenant l'antigène d'intérêt est incubé dans les puits d'une microplaque, puis les sites de la microplaque restés libres sont bloqués dans chaque puit par une substance. Un anticorps complémentaire (anticorps primaire de capture) est ensuite ajouté, qui se lie à l'antigène en formant un complexe immun. Cette méthode diffère de la méthode directe car l'anticorps spécifique à l'antigène n'est pas conjugué à une enzyme. On ajoute ensuite dans la solution un second anticorps, appelé anticorps de détection, lié à une enzyme, qui se fixera sur une région de l'anticorps primaire. Après rinçage et ajout du substrat, l'enzyme convertira ce chromogène ajouté à la préparation et la mesure de l'absorbance sera effectuée. La concentration de l'échantillon sera évaluée par rapport à la courbe standard préalablement effectuée. Le mécanisme de l'ELISA indirect est décrit dans la figure 20 ci-dessous (Salazar *et al.*, 2017).

2.1.2.1.2.2 Particularités

L'anticorps de détection est un anticorps souvent polyclonal ayant plusieurs sites de liaison compatibles avec l'anticorps de capture, ce qui amplifie encore plus le signal car plusieurs anticorps de détection peuvent se fixer sur l'anticorps de capture. Le fait que l'anticorps de détection ne soit pas conjugué avec une enzyme améliore la sensibilité du test par rapport à l'ELISA direct.

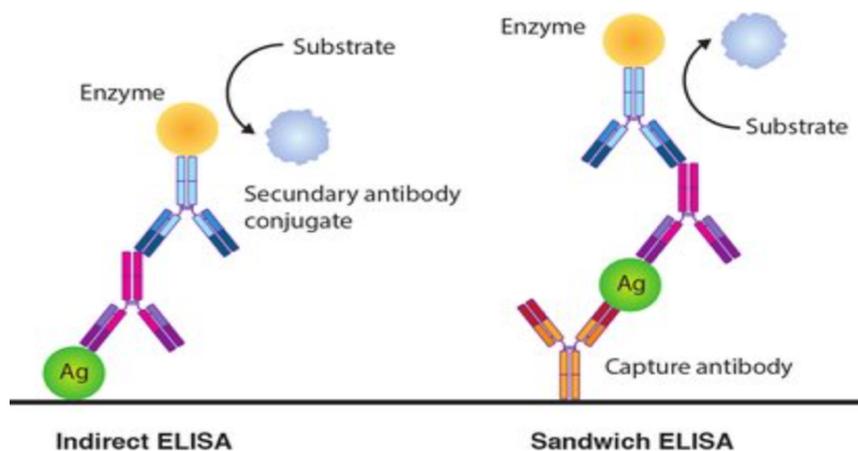
La limite de cette technique est liée aux échantillons complexes avec la possibilité d'absorption d'autres molécules à la surface du puit (dans les sites de la microplaque) diminuant la sensibilité du test en cas de faibles concentrations (Grange *et al.*, 2014 ; Parker *et al.*, 2016).

2.1.2.1.3 ELISA sandwich

2.1.2.1.3.1 Description

La technique ELISA sandwich est une technique ELISA courante en recherche. Son principe diffère des autres car le premier élément ajouté et absorbé à la surface des puits est l'anticorps spécifique à celui de l'antigène. Les sites de la microplaque sont ensuite bloqués par une substance, et aucune autre molécule ne peut se fixer à la surface. On ajoute ensuite l'échantillon et seul l'antigène d'intérêt peut rester sur la plaque puisqu'il est capable de se fixer à l'anticorps. Par la suite, il existe deux possibilités : ou bien on ajoute directement l'anticorps de détection lié à l'enzyme (comme pour un ELISA direct) ; ou bien on ajoute un anticorps de capture, suivi d'un anticorps de détection lié à l'enzyme (comme pour un ELISA indirect) (Grange *et al.*, 2014 ; Parker *et al.*, 2016). La figure 20 ci-dessous résume le principe d'ELISA indirect et d'ELISA sandwich.

Figure 20 : Principes des dosages ELISA indirect et par sandwich (Salazar *et al.*, 2017)



Pour l'ELISA indirect, l'antigène est lié à l'anticorps primaire de capture, en rose. L'anticorps de détection en bleu lié à l'enzyme de révélation se lie ensuite à l'anticorps primaire.

Pour l'ELISA sandwich, l'antigène se lie à l'anticorps de capture orange. Puis soit on ajoute un anticorps de détection directement ; soit comme sur le schéma on ajoute un second anticorps de capture lié à l'anticorps de détection.

2.1.2.1.3.2 Particularités

Les méthodes directes et indirectes ont pour limite la possible absorption dans le puits d'autres substances à doser que l'antigène d'intérêt lors du dosage d'un échantillon sanguin. En effet, le sang contient de nombreuses molécules pouvant se loger dans les puits à la place de l'antigène d'intérêt. La méthode sandwich permet de surmonter ce problème. L'avantage évident de cette méthode est l'amélioration de la sensibilité.

Cependant, pour que cette méthode fonctionne, deux anticorps spécifiques à l'antigène sont nécessaires. Ils doivent se lier à différents épitopes de l'antigène, et ceux-ci doivent être suffisamment éloignés l'un de l'autre pour ne pas empêcher la liaison de l'autre. Ceci induit une spécificité accrue de l'analyse induisant un coût plus élevé que les autres dosages ; c'est pour cette raison que cette technique est beaucoup plus utilisée en recherche (Grange *et al.*, 2014 ; Parker *et al.*, 2016).

2.1.2.1.4 ELISA par compétition : dosage de choix pour la progestérone

2.1.2.1.4.1 Principe

Le dosage ELISA par compétition fonctionne sur le même principe que le dosage RIA vu précédemment (Grange *et al.*, 2014). Un anticorps est fixé dans les puits d'une phase solide. L'antigène dont on cherche la concentration va rentrer en compétition avec un autre antigène, lié à l'enzyme de révélation pour les sites de fixation de l'anticorps. Après lavage de la solution, et révélation par le substrat enzymatique, la concentration de l'antigène peut être déterminée grâce à la courbe standard (Grange *et al.*, 2014).

2.1.2.1.4.2 Particularités

Cette technique est utilisée lorsqu'un seul anticorps est disponible pour l'antigène d'intérêt et surtout lorsque la concentration de la molécule d'intérêt est faible. La masse molaire de la progestérone et sa concentration sanguine étant faible, il s'agit d'un antigène à doser en quantité limitée. Les dosages ELISA non compétitifs, comme vus précédemment ne peuvent se réaliser en bonne condition que lorsque la concentration de l'antigène est en excès. La progestérone étant en quantité limitée, seuls les immuno-dosages par compétition sont possibles. La progestérone à doser entre en compétition avec une progestérone conjuguée à un marqueur pour se lier à un anticorps utilisé en quantité restreinte (Patrono et Peskar, 1987 ; Béné *et al.*, 2014). Ainsi, c'est le dosage ELISA par compétition qui est privilégié pour doser la progestérone, et qui est utilisé en médecine vétérinaire (Idexx Laboratories Inc, 2019).

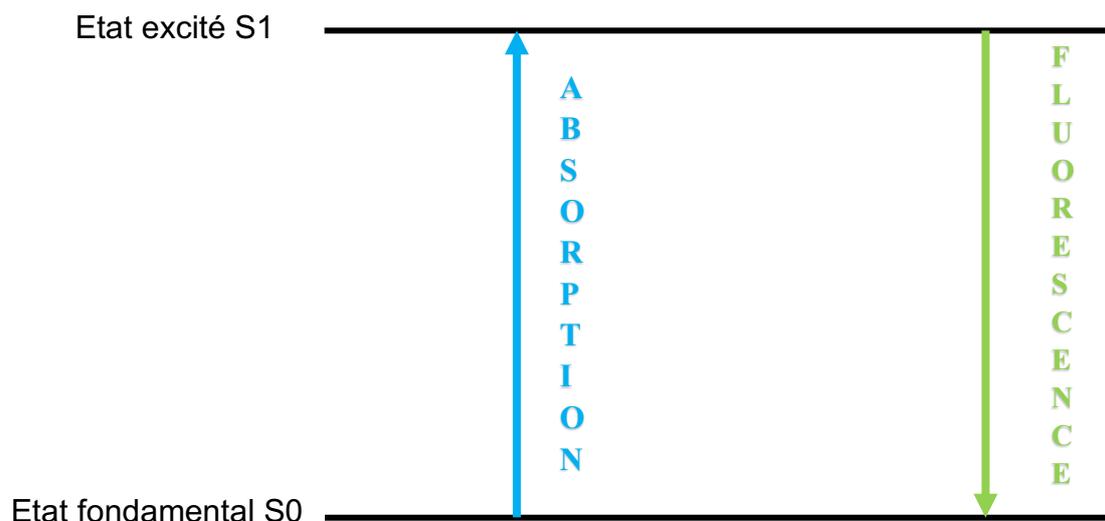
2.1.2.2 Immunodosages enzymatiques par fluorescence (FEIA et ELFA)

Ce type de dosage repose sur la détection de la fluorescence émise par un composé, dont l'intensité est corrélée à la concentration de l'antigène d'intérêt dosé. La technique ELFA pour le dosage de la progestérone chez la chienne est validée en 2011 (Brugger *et al.*, 2011).

2.1.2.2.1 Principe de fluorescence

La fluorescence correspond à un phénomène de luminescence, c'est-à-dire un phénomène d'émission de photons à partir d'une molécule dans un état électronique excité. L'état excité dans le cas de la fluorescence est lié à l'absorption de photons. En retournant à son état fondamental, la molécule restitue à l'environnement l'énergie des photons absorbés en émettant elle-même des photons. Quand la molécule retourne d'un état d'excitation de niveau 1 appelé singulet (S1) à son état fondamental, ce phénomène est appelé fluorescence. La figure 21 suivante schématise le principe de la fluorescence. Si le passage est effectué d'un niveau triplet, on parlera de phosphorescence. Seules les molécules appelées fluorophores ont cette capacité conférée par leur structure chimique, comme la fluorescéine qui contient trois noyaux aromatiques et un hétérocycle. Les propriétés des fluorophores varient en fonction de l'environnement (température, polarité, pH). La réémission de photons est quantifiée par le rendement quantique du fluorophore, dépendant de sa structure (Neuburger, 2006).

Figure 21 : Schéma simplifié du phénomène de fluorescence, (d'après Neuburger, 2006)



On observe ci-dessus le passage de l'état fondamental S0 à l'état excité par absorption photonique. Le retour à l'état S0 par émission photonique correspond au phénomène de fluorescence.

2.1.2.2.2 Principe des dosages FEIA ou ELFA

Le principe du dosage est sensiblement le même que les tests ELISA vus précédemment, mais dans le cas présent, l'ajout du substrat conduit, par action de l'enzyme, à la formation d'un composé fluorophore excité qui va émettre ainsi des photons.

La détection et quantification pour le dosage ELFA est réalisée par spectrofluorimétrie ou spectrophotométrie de fluorescence. Le spectrophotomètre va exciter l'échantillon avec un rayon de lumière et va ensuite évaluer l'intensité fluorimétrique de la solution. La détection et quantification pour le dosage FEIA est réalisée par cytométrie de flux : le cytomètre permet également la quantification de la réaction fluorescente. De la même manière que pour les dosages RIA et ELISA, la corrélation de l'intensité de la fluorescence avec la concentration de l'antigène d'intérêt nécessite le développement d'une courbe standard (Yolken et Stopa, 1979 ; Makler *et al.*, 1988 ; Hannon *et al.*, 2004 ; Neuburger, 2006).

2.1.2.2.3 Particularités

La sensibilité de détection par mesure de la fluorescence est supérieure à la colorimétrie ce qui permet le dosage d'une molécule d'intérêt dans de très faibles concentrations. Cette propriété permet en outre de limiter les coûts en termes de réactifs car de petits volumes peuvent être utilisés (Porstmann et Kiessig, 1992).

2.1.2.3 Avantages

Les dosages immunologiques quantitatifs qui utilisent pour marqueurs des enzymes présentent plusieurs avantages. Ils ont une sensibilité élevée et peuvent s'appliquer à tout type d'antigène d'intérêt dont on possède un anticorps spécifique. Les enzymes sont moins dangereuses et ont une durée de conservation plus longue que la plupart des traceurs radioactifs, permettant un accès à des structures moins spécialisées pour la réalisation d'analyses (Hannon *et al.*, 2004).

De plus, les procédures de dosages sont simples ; il est facile d'automatiser les procédures et de réaliser plusieurs dosages en même temps pour rentabiliser un automate. Enfin, les coûts des réactifs sont relativement faibles (Sakamoto *et al.*, 2018).

2.1.2.3.1 Avantages des dosages par colorimétrie

Les dosages immuno-enzymatiques par colorimétrie ont plusieurs avantages : le coût des spectrophotomètres est assez faible et permet donc le dosage d'hormones dans des laboratoires beaucoup moins spécialisés que pour le RIA ou encore le CLIA. Les mesures sont rapides et les chromophores ont une stabilité assez longue contrairement aux fluorophores. Cela permet une capacité de détection nécessitant un matériel plus abordable que pour le FEIA (Porstmann et Kiessig, 1992).

2.1.2.3.2 Avantages des dosages par fluorescence

L'avantage majeur des dosages par fluorescence est la possibilité de doser de multiples paramètres sanguins dans un même prélèvement en utilisant différentes longueurs d'ondes d'émission. Ils ont de plus une excellente sensibilité permettant des dosages à faibles concentrations ou volumes (Porstmann et Kiessig, 1992).

2.1.2.4 Inconvénients

2.1.2.4.1 Limites de spécificité liées aux propriétés enzymatiques

Les dosages immuno-enzymatiques présentent quelques inconvénients, par rapport à d'autres méthodes, liés à l'utilisation d'enzymes. En effet, l'activité enzymatique est dépendante des interférences et des conditions du dosage : la température, le pH, la présence de molécules inhibitrices dans l'échantillon... Les enzymes ont tendance à se lier de manière non spécifique aux molécules présentes dans le milieu de réaction, diminuant leur activité. La présence de lipides ou de bilirubine peut interférer avec les techniques enzymatiques. Les dosages immuno-enzymatiques des hormones peuvent présenter des réactions croisées avec d'autres hormones présentes dans les prélèvements, altérant la précision des tests (Ververidis *et al.*, 2002 ; Béné *et al.*, 2014)

De plus, la taille volumineuse des enzymes peut gêner la liaison spécifique d'un anticorps à son antigène. Ces propriétés liées aux propriétés intrinsèques des enzymes diminuent la spécificité des dosages enzymatiques par rapport aux dosages RIA (Hannon *et al.*, 2004).

2.1.2.4.2 Limites des dosages enzymatiques liées à des problèmes de détection

2.1.2.4.2.1 Limites des dosages par colorimétrie

Les dosages enzymatiques colorimétriques, en particulier les dosages non compétitifs, sont limités par la plage de travail du spectrophotomètre (environ 0,1 à 1,5 unité d'absorbance). Le stockage des réactifs et leurs caractéristiques doivent être particulièrement contrôlés. Les réactifs doivent être très peu photosensibles et ne doivent pas réagir avec des substances présentes dans l'échantillon. En outre, ils doivent avoir une forte constante d'association avec l'enzyme. De ces paramètres dépend la sensibilité du test colorimétrique qui est moins élevée que le dosage par fluorescence (Porstmann et Kiessig, 1992 ; Hannon *et al.*, 2004).

Les dosages quantitatifs colorimétriques sont moins sensibles que les autres à cause des imprécisions liées à l'absorbance de la solution, dont l'évaluation est beaucoup moins précise que les spectres d'émission en fluorescence. La faiblesse de leur précision est liée à la nécessité de l'ajout de la solution « bloquante ». En effet, l'acide sulfurique par exemple, est nécessaire pour stopper la réaction et « figer » la couleur avant la lecture par le spectrophotomètre. Des imprécisions naissent alors, liées à la concentration de l'agent bloquant, à son délai d'action, à la qualité de son stockage et enfin à son délai d'ajout dans la solution (Sakamoto *et al.*, 2018).

2.1.2.4.2.2 Limites des dosages par fluorescence

La température, la polarité, le pH et la teneur en oxygène dissous ont une incidence sur les tests immuno-fluorescents car ces paramètres peuvent modifier l'intensité de la fluorescence. Des interférences pouvant biaiser les valeurs proviennent de la diffusion de la lumière (particules), de la fluorescence naturelle (protéines, bilirubine...) et des effets d'extinction de certaines molécules dans

l'échantillon. L'effet d'extinction correspond à la capacité de certaines molécules en solution d'absorber la lumière. De plus le matériel nécessaire pour réaliser un dosage par fluorescence a un coût plus élevé que pour un dosage colorimétrique (Hannon *et al.*, 2004).

2.1.3 Dosage immunologique par chimiluminescence ou CLIA

Le dosage immunologique par chimiluminescence pour doser la progestérone chez la chienne a été homologué en 2003 (Kutzler *et al.*, 2003).

2.1.3.1 Principe de chimiluminescence

La chimiluminescence est la production de lumière à la suite d'une réaction chimique. Un système chimio-luminescent va générer une molécule organique dans un état excité électroniquement qui va émettre des photons pour retourner à son état fondamental. En général, la luminescence est l'émission d'un rayonnement visible ou quasi-visible de longueur d'onde de 300 à 800 nm. C'est la réaction chimique dans l'échantillon, le plus souvent une oxydation, qui va « exciter » la molécule. Elle est déclenchée par l'ajout d'un agent oxydant (Hannon *et al.*, 2004).

2.1.3.1.1 Principe de la technique CLIA

Le dosage immunologique chimiluminescent (CLIA) est une technique immunologique dans laquelle le marqueur est une molécule luminescente. Les dosages CLIA de progestérone sont généralement des dosages par compétition réalisés sur des phases solides suivant le même principe que les dosages ELISA vus précédemment. Le luminophore peut être fixé directement sur un analyte, un antigène, un substrat ou un anticorps. Le luminophore est activé par réaction chimique. Les dosages CLIA font le plus souvent intervenir une enzyme permettant l'activation de la réaction à l'origine de l'émission de la luminescence.

La différence fondamentale avec le dosage ELISA est que la luminescence peut être quantifiée. En effet, c'est un luminomètre qui mesure l'intensité lumineuse émise dans la solution. Cet appareil contient un photomultiplicateur et un détecteur de lumière pour dénombrer le nombre de photons et un convertisseur qui affiche le résultat en Unités de Lumière Relatives ou RLU. Cela permet de déduire la concentration de la solution à partir des courbes étalons réalisées préalablement aux dosages (Hannon *et al.*, 2004 ; Cinquanta *et al.*, 2017).

2.1.3.1.2 Particularités

D'après certains auteurs, la sensibilité de détection des dosages CLIA a la particularité de pouvoir être renforcée par l'ajout d'ions métalliques ou de ferrocyanure. Cela permettrait d'en augmenter la sensibilité jusqu'à 10^{-16} mol (Cinquanta *et al.*, 2017).

2.1.3.2 Avantages des dosages par chimiluminescence

Les réactifs luminescents sont généralement stables et non toxiques, permettant une longue stabilité de la courbe d'étalonnage des automates. La sensibilité de cette méthode est excellente. L'utilisation de plateformes automatisées basées sur la technologie CLIA permet d'obtenir des réactions immunochimiques en phase solide avec des temps d'exécution nettement plus courts (30-40 min) que les autres types d'immunodosages (Cinquanta *et al.*, 2017).

2.1.3.3 Limites des dosages par chimiluminescence

La détection des photons étant une méthode très sensible, des signaux contaminants peuvent provenir de diverses sources. Les organismes biologiques produisent des matériaux luminescents ; les solutions de nettoyage et la poussière de laboratoire peuvent contenir des substances qui produisent de la lumière pouvant interférer avec le dosage (Cinquanta *et al.*, 2017).

De plus il est primordial que le dosage soit fait dans le noir complet car la moindre source de lumière extérieure nuit à la détection du luminomètre. Enfin, les coûts des dosages CLIA sont plus élevés que les dosages ELISA, bien que plus abordables que les dosages par fluorescence (Cinquanta *et al.*, 2017).

2.2 Techniques immunologiques semi-quantitatives

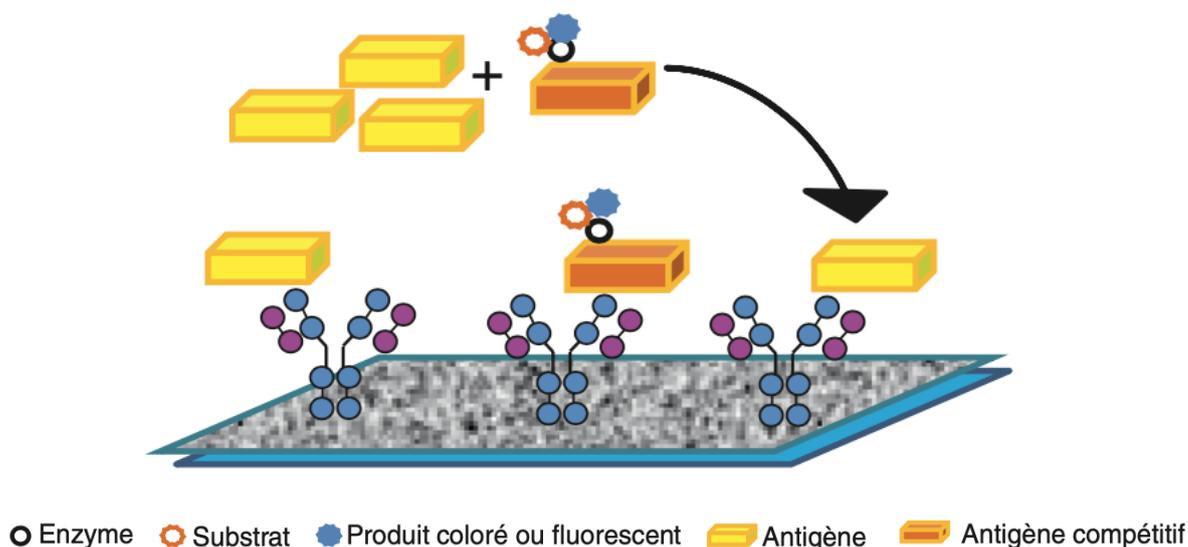
Les tests semi-quantitatifs sont des tests rapidement exécutables, faciles d'accès, qui donnent une approximation de la valeur de concentration cherchée en fonction d'un témoin de couleur. Ces tests fonctionnent par test ELISA par compétition. Ils sont encore utilisés en pratique courante car ils ne nécessitent pas de matériel particulier pour leur réalisation.

2.2.1 Principe

2.2.1.1 Principe d'ELISA par compétition

La première étape du test semi-quantitatif est une étape par dosage par compétition. Le principe du dosage ELISA par compétition a été vu dans la partie 2.1.2.1.4. On ajoute dans un puits contenant l'anticorps d'intérêt, une goutte de la solution contenant la progestérone à doser. On ajoute une solution dans le puits contenant une progestérone marquée associée à un chromogène qui rentre en compétition pour l'anticorps. Le puits contient donc à la fois de la progestérone marquée et de la progestérone à doser. Après un lavage, on ajoute un substrat dont le produit de dégradation par la progestérone marquée colore l'échantillon. On peut lire ensuite l'intensité de la concentration par vérification visuelle. En effet, plus la concentration initiale de progestérone est élevée, moins la progestérone marquée peut se lier aux anticorps, et moins l'échantillon sera coloré (Béné *et al.*, 2014). La figure 22 ci-dessous récapitule le principe.

Figure 22 : Principe du test ELISA par compétition. (Béné et al. 2014)



L'antigène d'intérêt en jaune rentre en compétition pour les sites de liaison avec l'antigène marqué par une enzyme en orange. Après ajout du substrat et lavage la mesure de l'absorbance de la solution permet de définir la concentration en antigène d'intérêt.

2.2.1.2 Témoins de concentration : une nécessité

Comme ce test est semi-quantitatif, il faut comparer la couleur de l'échantillon avec deux témoins de concentration. Les tests semi-quantitatifs sont utilisés chez la chienne pour déterminer si la progestérone franchit des valeurs seuils. Les industriels choisissent deux échantillons « étalons » à concentration connue de progestérone. Le premier échantillon étalon est à concentration « faible », le second à concentration « élevée ». Ces étalons seront dosés par ELISA compétitif en même temps que la solution de concentration inconnue. Les marqueurs de couleur permettent alors de définir l'intervalle de concentration de progestérone, comme le montre la notice d'utilisation 23 ci-dessous.

Figure 23 : Lecture de l'intervalle du taux de progestérone sérique par test semi-quantitatif, (Biovét Inc., 2016)

APPLI- CATIONS	A B Éch.	A B Éch.	A B Éch.	A B Éch.	A B Éch.
	L'échantillon est plus rose que le A (étalon bas). La concentration en progestérone est inférieure à celle de l'étalon bas (3 ng/mL).	L'échantillon est aussi rose que A (étalon bas). La concentration en progestérone est autour de 3 ng/mL.	L'échantillon est plus pâle que l'étalon A mais plus foncé que l'étalon B. La concentration en progestérone est entre 3 et 10 ng/mL.	L'échantillon est identique à B (étalon fort). La concentration en progestérone est autour de 10 ng/mL.	L'échantillon est plus clair que B (« talon fort»). La concentration en progestérone est supérieure à 10 ng/mL.

2.2.2 Avantages

Les analyses semi-quantitatives ont un avantage majeur qui est le faible coût de réalisation. Les kits sont produits en grande quantité et le matériel nécessaire pour la réalisation du test est peu coûteux. Il n'y a pas besoin de réaliser un investissement d'une machine de lecture et l'opérateur n'est pas spécialisé. Le délai d'obtention du résultat est très rapide : environ 45 minutes. Enfin, la conservation du kit est facile et peu encombrante (Niewiadomska et Fontbonne, 2020 ; Biovet Inc., 2016)

Il est donc très avantageux en clinique non spécialisée pour un dosage ponctuel de progestérone.

2.2.3 Inconvénients

Le biais de lecture est un des inconvénients majeurs du test. En effet, la précision du test baisse lorsque c'est l'appréciation du lecteur qui estime la valeur de progestérone en comparant des colorations. Enfin, lorsque la progestérone se rapproche des valeurs seuils il est délicat de trancher sur un côté ou l'autre de l'intervalle.

Les tests semi-quantitatifs ne présentent de plus qu'un faible intérêt dans le suivi du taux de progestérone pour un suivi de chaleurs. Ils ne détectent que des évolutions entre des seuils et la colorimétrie n'est pas fiable pour comparer deux prélèvements. De plus, la présence de lipides, ou de bilirubine peut interférer avec les techniques enzymatiques et il existe des réactions croisées avec d'autres hormones présentes dans les prélèvements comme le cortisol ou l'œstradiol 17- β , altérant la précision des tests. La température de la pièce, la méticulosité de l'opérateur et le non respect des temps de rinçage qui ne sont pas réalisés par une machine altèrent également la précision des tests qui sont désormais moins recommandés que les méthodes quantitatives (Ververidis *et al.*, 2002 ; Béné *et al.*, 2014).

2.3 Dosage quantitatif par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est une méthode de dosage récente qui associe la technique de chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse.

2.3.1 Principe de la LC-MS

2.3.1.1 Principe de la chromatographie en phase liquide

La chromatographie est une technique de séparation de différents composés d'une substance basée sur leur différence de solubilité dans différentes phases. La chromatographie en phase liquide regroupe les différentes techniques qui effectuent cette séparation grâce à un liquide, appelé phase mobile, entraînant les composés à travers un solide « divisé », appelé phase stationnaire. Ce solide est placé généralement dans une colonne chromatographique.

Un chromatographe va réaliser au fur et à mesure de la séparation un chromatogramme. Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation de l'intensité du signal de détection en fonction du temps. On observe ainsi des pics chromatographiques en fonction du temps qui correspondent chacun à un des constituants du mélange. Chaque constituant est caractérisé par son temps de rétention correspondant au temps écoulé entre le début de la séparation et la survenue du pic maximal du constituant (Pitt, 2009 ; Vialaret, 2019).

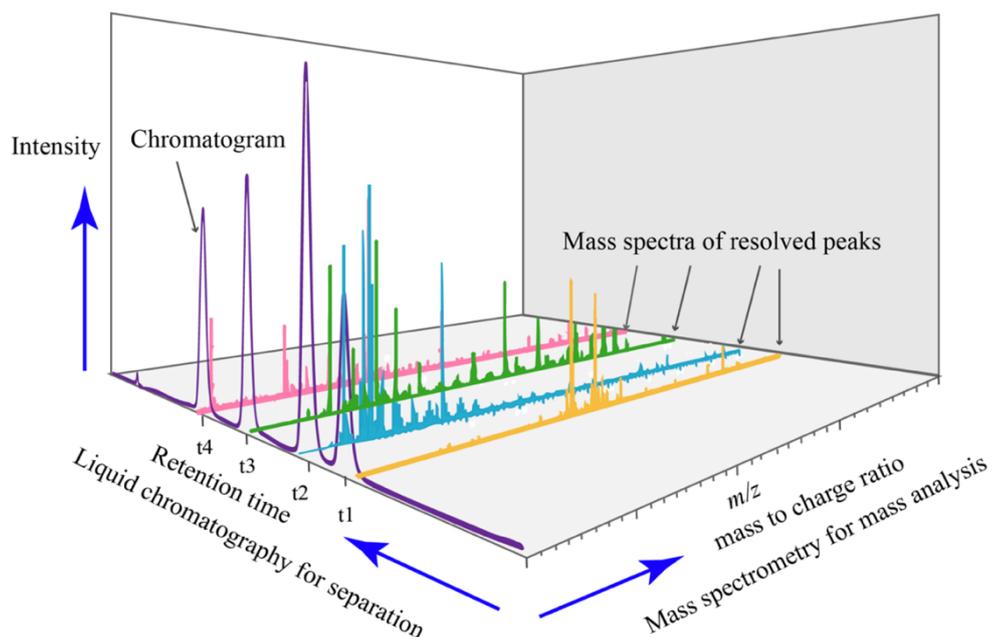
2.3.1.2 Principe de la spectrométrie de masse

Introduite au début du vingtième siècle, elle permet la mesure du rapport masse sur charge d'ions en phase gazeuse (m/z). Les spectromètres de masse fonctionnent en ionisant les molécules de l'échantillon et en séparant ensuite les ions produits selon leur rapport m/z . Un détecteur compte les ions et transmet un signal amplifié à un ordinateur qui établit le spectre de masse.

Un spectromètre de masse se compose en quatre parties. La première est le système d'introduction de l'échantillon. La seconde est la source d'ionisation qui provoque l'évaporation et l'ionisation des molécules, qui deviennent ionisées à l'état gazeux. Il existe une multitude de types de source (électronique, chimique...). La troisième partie ou analyseur de masse permet l'accélération des ions formés et la séparation de ces ions dans un élément, en fonction de leur rapport m/z (masse sur charge). La dernière partie correspond au détecteur, qui permet l'obtention du spectre de masse. Un spectre de masse donne l'abondance des ions en fonction de leur caractéristique intrinsèque m/z . Il permet donc de quantifier la quantité d'ions formés (Vialaret, 2019).

La figure 24 ci-dessous permet de visualiser un spectre de masse obtenu par LC-MS.

Figure 24 : Spectre 3D de LC-MS (chromatogramme combiné avec le spectre de masse, d'après Wikipedia, image libre de droit « Liquid chromatography MS spectrum 3D analysis »)



À gauche du graphique précédant on observe la séparation des différents composés par migration chromatographique en pics temporels différents. Chacun de ces composés séparés va ensuite être analysé par le spectromètre de masse qui représentera leur rapport m/z sur la droite du graphique avec en ordonnée l'intensité correspondant à la quantification d'ions formés, et donc de définir la concentration du composé.

2.3.1.3 Principe du dosage LC-MS

La LC-MS correspond à une technique de séparation des différents constituants d'un mélange par chromatographie, couplée à une technique d'analyse de la concentration des différents constituants par spectrométrie de masse dans lequel le système d'introduction de l'échantillon est associé à la colonne chromatographique. Cette technique est particulièrement performante dans les secteurs de recherche en biotechnologies, cosmétique, surveillance de l'environnement et médicale. Elle est très sensible pour analyser les différents constituants d'un échantillon complexe (Vialaret, 2019).

2.3.2 Avantages de la LC-MS

Un des atouts majeurs de la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse est sa précision. Elle est très spécifique et sensible. Elle permet en outre de déterminer des quantités faibles d'une molécule grâce à une séparation des autres constituants au préalable par chromatographie et par une détection par ionisation est très sensible. En outre, elle surpasserait la sensibilité analytique de la RIA. En effet, d'après certains auteurs, lorsque la concentration de la molécule d'intérêt est trop faible dans l'échantillon initial pour permettre une bonne dilution, il est préférable d'utiliser la LC-MS par rapport à la RIA (Patrono et Peskar, 1987).

Enfin, son utilité majeure est la possibilité de quantification de plusieurs dizaines de molécules dans un échantillon lors d'une seule analyse (Pitt, 2009 ; Vialaret, 2019).

2.3.3 Inconvénients de la LC-MS

2.3.3.1 Lié à l'échantillon

La présence simultanée de plus d'un composant passant dans la source d'ionisation peut entraîner une concurrence dans le processus ionisant et une réduction ultérieure des signaux en spectrométrie. Le signal d'un composant dans un mélange sera en effet inférieur à celui du composant pur à la même concentration. Ce phénomène est appelé suppression d'ions. Le sel et autres composants présents dans les échantillons de plasma, de sérum et d'urine constituent une limite particulière. Les tampons et autres additifs en phase mobile sont également des sources de suppression. Le passage par la chromatographie permet cependant de contrecarrer cet effet (Pitt, 2009).

2.3.3.2 Lié à la technicité du dosage

Les dosages LC-MS ne sont réalisés que dans des laboratoires de taille conséquente et spécialisés, mais ne peuvent pas être effectués en routine en clinique vétérinaire. En effet, l'instrumentation présente un coût extrêmement élevé. De plus, bien que les performances et la fiabilité des systèmes LC-MS continuent de s'améliorer, ils nécessitent plus d'attention et de maintenance que les systèmes plus classiques. Des temps d'arrêt d'un jour ou plus se produisent occasionnellement, et un deuxième instrument est souvent nécessaire pour les délais d'exécution critiques. En outre, l'exploitation et la maintenance des systèmes LC-MS nécessitent un personnel très qualifié (Pitt, 2009).

2.4 Dosages quantitatifs par fluorescence améliorée

Les deux techniques présentées ci-dessous utilisent deux systèmes d'amplification physique d'un signal fluorescent pour améliorer la détection d'un composé.

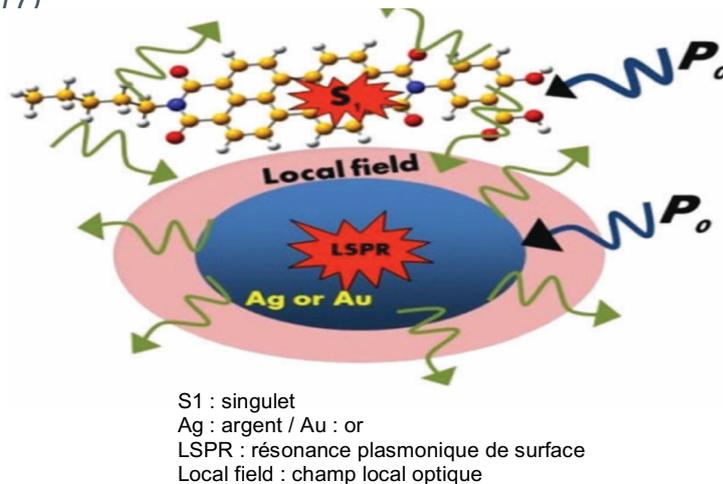
2.4.1 Fluorescence améliorée de plasmons de surface (SPFS)

Il existe une technique plus récente qui allie la résonance plasmonique de surface à la spectroscopie de fluorescence appelée également SPFS permettant la réalisation de dosages quantitatifs de molécules d'intérêt. C'est une technique utilisée pour augmenter le champ d'émission de la fluorescence tout en incorporant une détection optique par plasmon de surface.

Un plasmon est une oscillation de plasma quantifiée, et correspond dans le cas présent à une excitation collective d'un « fluide » électronique dans un morceau de métal conducteur. Il peut être considéré comme une quasi-particule, de la même manière que les ondulations observées à la surface d'une mare représentent un mouvement de molécules d'eau uniforme (Davies, 2013).

Les plasmons excités par un rayonnement électromagnétique émettent une luminescence faible. Ils présentent cependant une section d'extinction optique bien plus élevée que les fluorophores moléculaires, permettant d'améliorer leur détection optique à proximité. En combinant les deux techniques de détection, on observe une intensité spectrale d'émission accrue pour le fluorophore moléculaire. En effet, le contact de la molécule avec la surface du métal améliore le champ local optique du fluorophore : le couplage avec la résonance plasmonique de la surface permet une diffusion élastique de la lumière (Li *et al.*, 2017). La figure 25 ci-dessous résume le procédé. On peut donc quantifier avec précision la présence d'une hormone liée à une molécule fluorescente couplée à une surface métallique spécifique, souvent de l'or.

Figure 25 : Principe simplifié de la méthode SPFS, (Li et al., 2017)



Le fluorophore moléculaire est excité par P_0 en singulet S1 qui va émettre de la fluorescence représentée par les flèches vertes. Les plasmons dans le métal en bleu foncé vont être excités, et vont émettre des photons représentés par les flèches vertes. Les deux techniques permettent de renforcer le signal du champ local optique et donc une meilleure détection de la fluorescence.

2.4.2 Fluorescence induite par laser (LIF)

Cette technique utilise les propriétés d'amplification des signaux optiques par émission d'un laser dans le milieu de propagation de la lumière pour affiner la lecture des appareils d'un signal fluorescent.

Ce dosage repose sur l'utilisation de microbilles contenant des anticorps complémentaires fixés à des fluorochromes, le plus souvent émettant dans le rouge et l'orange. Elles sont incubées avec les échantillons à analyser dans des plaques. Après fixation et lavage, la solution est entraînée à travers un fluorimètre ou un cytomètre en flux. Après excitation par un laser, chaque bille émet une fluorescence et l'appareil mesure l'intensité fluorescente de la solution et en déduit la concentration en molécule d'intérêt. Les kits comportent des nanoparticules de contrôle. Leur utilisation permet de déterminer l'intensité de fluorescence associée au bruit de fond de la réaction. Les automates calibrent leurs valeurs par rapport aux valeurs de contrôle de solutions étalons de progestérone (Béné *et al.*, 2014).

2.4.3 Avantages

2.4.3.1 Avantages du dosage SPFS

La combinaison des deux techniques permet d'accroître la sensibilité de détection pouvant aller jusqu'au nanogramme de concentration. Il est même théoriquement possible de distinguer la présence d'une seule molécule en contact avec les nanoparticules métalliques (Liebermann et Knoll, 2000 ; Li *et al.*, 2017). Depuis peu un automate présentant cette technique est disponible en clinique vétérinaire pour des dosages hormonaux (Fontbonne *et al.*, 2021).

2.4.3.2 Avantages du dosage par la LIF

Les dosages par technique LIF ne nécessitent qu'un faible volume d'échantillon (quelques dizaines de μl), ils sont très rapides et ont un domaine de mesure assez étendu. De plus, ils ont une sensibilité au moins aussi bonne que les techniques ELISA. Enfin, les applications des dosages par technique LIF sont nombreux dans les domaines de la recherche en biologie médicale et physique pour des dosages dans différents milieux (Béné *et al.*, 2014).

2.4.4 Inconvénients

2.4.4.1 Inconvénients du dosage SPFS

Le dosage SPFS est un dosage assez récent, qui n'est pas encore largement répandu. Il est surtout utilisé en recherche car la fabrication des substrats métalliques, les matériels de dosage et la maintenance des automates nécessitent une certaine expertise. Enfin, l'utilisation de substrats métalliques comme l'or ont de nos jours a impact écologique et social particulièrement néfaste lié à leur extraction (Liebermann et Knoll, 2000 ; Béné *et al.*, 2014). Un automate à destination des vétérinaires est cependant depuis peu disponible sur le marché (Fontbonne *et al.*, 2021).

2.4.4.2 Inconvénients du dosage LIF

Un des inconvénients majeurs de la technique LIF est la mise au point et la calibration délicate. De plus, il existe des risques de réactivité croisée lorsque le dosage est associé à des couplages avec des anticorps. Les lasers sont sensibles aux variations de température et les nanoparticules à la lumière. Les automates doivent être de plus fréquemment calibrés. Enfin, comme pour la technique ELISA, la présence de lipides, de bilirubine ou encore de facteurs rhumatoïdes peut causer des interférences (Béné *et al.*, 2014).

Nous avons vu dans cette deuxième partie qu'il existe de nombreuses techniques permettant de doser la progestérone chez la chienne. Chaque technique possède des avantages et des limites que les vétérinaires doivent prendre en compte dans leur pratique. Le but de cette dernière partie est de comparer les différentes solutions à destination vétérinaire, de leurs caractéristiques d'utilisation à leurs performances.

3 Comparaison des différentes techniques de dosage de la progestérone chez la chienne

Nous avons vu précédemment qu'il existe de nombreuses indications pour le dosage de la progestérone chez la chienne, les deux principales étant la détermination des dates de l'ovulation et du terme. Cependant, la demande croissante et l'exigence de nombreux éleveurs implique un suivi particulier du cycle des reproductrices dans d'autres contextes. Ainsi, il existe de nombreuses autres applications de ce dosage comme l'exploration de retards de chaleurs, de l'insuffisance lutéale et des anomalies de cycle qui nécessitent des dosages de progestérone. Selon le type de clientèle, il y a un réel intérêt à s'équiper afin de pouvoir réaliser des dosages à la clinique. Nous allons comparer dans cette partie les différentes solutions à la disposition des vétérinaires, la performance des automates, ainsi que leurs intérêts et limites respectifs.

3.1 Comparaison des possibilités à disposition des vétérinaires pour le dosage de la progestérone chez la chienne

L'ordonnance de réforme de la biologie médicale, ratifiée par la loi du 30 mai 2013 (<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000027478077>) a scindé les laboratoires de biologie médicale et vétérinaire. Auparavant, les laboratoires de biologie médicale permettaient de donner un résultat rapide. Désormais, ils n'ont plus le droit d'analyser des prélèvements vétérinaires. Les échantillons doivent être acheminés vers des laboratoires vétérinaires de référence, moins répandus sur le territoire.

Avant 2013, le dosage de la progestérone *in situ* chez la chienne n'était donc pas majoritairement répandu au sein des cliniques vétérinaires, mais il devient intéressant désormais d'évaluer les différentes possibilités actuelles.

3.1.1 Dosage externe ponctuel de la progestérone en laboratoire de référence

3.1.1.1 Envoi de prélèvements aux laboratoires vétérinaires de référence

Si les vétérinaires ne disposent pas d'analyseur sur place, ils doivent désormais envoyer par transporteur leurs prélèvements à un laboratoire de référence. Les techniques utilisées en laboratoire sont le plus fréquemment les dosages par CLIA ; la technique CLIA Immulite 1000 et 2000 des laboratoires Siemens est la plus utilisée en France (Idexx, Vebio). Un autre analyseur CLIA, l'Elecsys des laboratoires Roche

Diagnostique, est également très utilisé dans les pays anglo-saxons. Les analyseurs CLIA permettent en outre le dosage de nombreux autres paramètres sanguins que la progestérone.

Ces laboratoires centralisent les prélèvements envoyés par plusieurs cliniques et regroupent les dosages. Il leur est nécessaire de posséder des appareils performants, dont le coût et l'entretien sont amortis par le nombre conséquent de dosages, les rendant très attractifs pour les laboratoires de référence.

3.1.1.2 Avantages des dosages en laboratoire de référence

Pour le vétérinaire, l'envoi du dosage en laboratoire de référence permet de ne facturer au propriétaire que l'analyse et le transport, sans devoir amortir le coût d'un automate. La technique CLIA nécessite en outre un entretien quotidien des automates à l'aide d'un personnel qualifié. Cela permet au vétérinaire de s'affranchir de toute gestion de matériel et de personnel tout en garantissant au propriétaire un dosage précis et performant pour son animal. De plus, l'envoi de prélèvements à un laboratoire permet de grouper des analyses spécifiques multiples au besoin. Les laboratoires vétérinaires mettent à disposition toutes les analyses disponibles à usage vétérinaire. Une utilité majeure consiste à grouper les coûts d'envoi et envoyer des bilans très spécifiques non accessibles *in situ* en clinique vétérinaire (Fontbonne, 2020).

Il existe en outre des bilans de « mise à la reproduction » qui permettent de détecter des potentiels facteurs d'avortement ou de mortinatalité, trouvant toute leur utilité auprès d'éleveurs. Ces coûts peuvent donc être groupés en y associant les dosages de progestérone lors d'un suivi de chaleurs par exemple (Orbio Laboratoire, 2019).

3.1.1.3 Limites des dosages en laboratoire de référence

3.1.1.3.1 Coût pour le propriétaire

Le coût du dosage est d'une cinquantaine à une soixantaine d'euros (Orbio Laboratoire, 2019). Il existe différentes possibilités de facturation : soit le laboratoire facture directement l'analyse au vétérinaire, soit le propriétaire adresse un chèque à destination du laboratoire, soit la facturation est envoyée au propriétaire (souvent des éleveurs) (Orbio Laboratoire, 2019). Cette facturation ne comptant pas le coût de la prise de sang ni du matériel, il faut ajouter à cette somme les tarifs de prélèvement. Les coûts peuvent donc être élevés pour un seul dosage hormonal. De plus, il a été montré que les mesures de progestéronémie selon différentes méthodes de laboratoire chez la chienne peuvent conduire à des résultats apparemment différents (Thuróczy *et al.*, 2016).

Ainsi, dans le cadre d'un suivi de chaleurs avec dosages réguliers par exemple, il est recommandé de toujours utiliser les mêmes méthodes de mesure. Si les prélèvements sont envoyés en laboratoire, le coût devient conséquent.

3.1.1.3.2 Délai d'obtention

Le délai d'obtention des résultats est en moyenne d'un jour après envoi (Orbio Laboratoire, 2019). C'est une limite majeure de ce choix car la majorité des dosages de progestérone réalisés sont urgents. En effet que ce soit pour évaluer la date de

fécondité optimale pour des éleveurs, pour s'assurer de l'absence d'insuffisance lutéale (ou à défaut la traiter) ou encore évaluer la date de parturition dans le cadre d'une césarienne programmée, les résultats doivent être obtenus rapidement pour prendre une décision.

3.1.1.3.3 Lié à la gestion du prélèvement pour le vétérinaire

Le vétérinaire doit fréquemment centrifuger et récolter le sérum ou le plasma (en fonction du type de prélèvement demandé par le laboratoire), puis le conserver à 4°C avant de l'envoyer par transporteur. La conservation à basse température est exigée par certains laboratoires mais ne présenterait pas d'intérêt particulier (THUROC). Cela demande une certaine logistique, pouvant être contraignante lors de journées intensives.

3.1.2 Dosages *in situ* de la progestérone

Depuis que les prélèvements ne peuvent plus être envoyés en laboratoire de santé humaine, les dosages externalisés ont un coût, un délai et un transport représentant des inconvénients plus importants. De nombreuses solutions déjà présentes sur le marché depuis des années, ou récemment introduites, sont des alternatives à l'externalisation des dosages et permettent aux vétérinaires de réaliser ces dosages au chevet des patients.

3.1.2.1 Une multitude de dosages réalisables en clinique

De nombreux analyseurs sont désormais disponibles sur le marché permettant de doser la progestérone. Ils seront décrits plus loin dans la partie 3.2. Leurs caractéristiques respectives ainsi que leurs performances seront évaluées respectivement dans la partie 3.3 et 3.2.

3.1.2.2 Avantages des dosages *in situ*

Les analyses *in situ* présentent un avantage majeur qui est un délai d'obtention de résultat rapide. Une fois le prélèvement réalisé, la mesure de concentration peut être réalisée dans un quart d'heure à trois quart d'heure selon l'automate. Ainsi, toute décision majeure clinique est rapidement prise permettant une insémination dans des délais convenables, ou une décision chirurgicale.

Le coût pour le propriétaire peut être amorti en fonction du nombre d'analyses réalisées sur analyseurs. En fonction de la technique utilisée, il est généralement plus rentable d'utiliser un dosage *in situ*, à condition d'avoir une utilisation régulière de l'automate ou de la technique utilisés pour rentabiliser. Le vétérinaire peut choisir en fonction des différentes options celle qui correspond le mieux à son utilisation. Pour le propriétaire, le coût d'un dosage unique est généralement similaire au laboratoire, car le transport a un coût. Lorsque plusieurs dosages doivent être effectués, il est plus rentable pour le propriétaire que le dosage soit effectué sur place (Fontbonne, 2020).

De plus, le personnel nécessaire pour réaliser ces dosages ne doit pas être spécialisé contrairement au matériel de laboratoire agréé. Les dosages peuvent être réalisés par les auxiliaires vétérinaires (Niewiadomska et Fontbonne, 2020).

Enfin certains automates présents sur le marché permettent de doser des paramètres biochimiques et hormonaux multiples. Ainsi les vétérinaires peuvent désormais s'affranchir la majeure partie du temps des laboratoires de référence et de leurs délais pour certaines analyses utiles en pratique régulière.

3.1.2.3 Limites des dosages *in situ*

Les limites des dosages *in situ* diffèrent selon le type utilisé. Les automates de biochimie utilisant des techniques de fluorescence par exemple nécessitent un entretien régulier et des contrôles techniques. De plus, il est fréquent que les personnes qui réalisent les dosages ne soient pas bien formés, ce qui peut induire des erreurs pré-analytiques dans les résultats obtenus (échantillon mal conservé, sérum pas assez centrifugé...). Leur coût doit également être amorti au cours des années. Leur utilisation doit donc être rentable pour le vétérinaire (Fontbonne, 2020).

Les dosages ELISA semi-quantitatifs quant à eux sont peu précis bien que ne nécessitant pas d'entretien particulier (Fontbonne, 2020).

3.2 Comparaison de la performance de dosage des différentes techniques et analyseurs de la progestérone chez la chienne

La progestérone peut être dosée à l'aide de différentes techniques étudiées dans la partie précédente. Ces dosages ont pu être développés pour un usage automatisé. Comme vu préalablement, le dosage de la progestérone nécessite une précision et une fiabilité de résultats car cette hormone a une plage de concentration variable selon le cycle de la chienne. Il s'agit ici de comparer les performances de dosage des différents automates à disposition des vétérinaires pour en évaluer dans un premier temps la fiabilité.

3.2.1 Méthode de comparaison de la performance d'un analyseur

3.2.1.1 Paramètres de comparaison statistique

Il existe des paramètres qui ont été communément acceptés pour évaluer la performance d'analyseurs : l'exactitude, la précision, la sensibilité, la spécificité et la concordance (Rannou et Nicolas, 2018).

3.2.1.1.1 Évaluation des relations entre deux séries de variables quantitatives

La concordance est une caractéristique permettant d'évaluer l'équivalence de séries de résultats entre le test à vérifier et un test de référence comparable, soit savoir si deux méthodes de mesure fournissent les mêmes résultats lorsqu'elles mesurent la même chose dans les mêmes conditions.

Il existe différentes manières statistiques présentées dans la littérature permettant d'évaluer la concordance entre des séries quantitatives comme le coefficient de concordance de Lin, le coefficient de corrélation de Pearson, les comparaisons de séries appariées avec les graphiques de Bland-Altman, le test de Student ou le coefficient de concordance intraclasse. Le coefficient de corrélation de Pearson est le plus utilisé dans les études statistiques réalisées il y a une dizaine d'années.

Cependant, il semblerait qu'il soit de nos jours préférable d'utiliser le coefficient de Lin pour évaluer la concordance de deux mesures quantitatives (Desquilbet, 2020). Le coefficient de corrélation de Pearson quantifie la relation linéaire existant entre les deux séries de mesures. Si les mesures s'éloignent de part et d'autre de la droite de régression estimée à partir des deux séries de mesures, il y a un manque de « précision » autour de la droite. Le coefficient de corrélation de Pearson ne prend pas en compte l'exactitude de la concordance, seulement sa précision. Le coefficient de Lin quantifie la précision de la concordance mais également la déviation systématique par rapport à la droite de concordance parfaite (de pente 45°). Il évalue également de cette manière l'exactitude de la concordance (Hannon *et al.*, 2004 ; Desquilbet, 2020).

Ces différences conduisent par conséquent à une surestimation systématique de la valeur du coefficient de corrélation de Pearson comparée à celle du coefficient de concordance de Lin (Hannon *et al.*, 2004 ; Desquilbet, 2020).

3.2.1.1.2 Évaluation de la précision d'une méthode

Nous avons vu comment évaluer les différences entre deux méthodes. Il existe une manière d'évaluer la précision d'une même méthode. La précision fait référence au degré de concordance entre les résultats d'un dosage répété plusieurs fois soit dans les mêmes conditions analytiques (on parle alors de répétabilité), soit sur plusieurs cycles de mesure différents, dans des conditions différentes (correspondant à la reproductibilité). Elle dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et ne se rapporte pas à une référence ou à une valeur réelle. Déterminée qualitativement comme "élevée", "moyenne" ou "faible", elle est exprimée mathématiquement en termes d'imprécision (c'est-à-dire la dispersion des résultats des mesures obtenues dans des conditions spécifiées) (Hannon *et al.*, 2004 ; Rannou et Nicolas, 2018).

Le coefficient de variation ou CV intra-essai est une mesure de la variance entre les points de données au sein d'un essai, c'est-à-dire les répliques d'échantillons analysées sur la même plaque. Le CV inter-essai est une mesure de la variance entre les répétitions d'échantillons sur différentes plaques qui peut être utilisée pour évaluer la cohérence entre les plaques. De manière générale, on considère qu'on peut avoir confiance en la précision d'un test immunologique lorsque le CV inter-essai est inférieur à 15% et intra-essai inférieur à 10% (Hannon *et al.*, 2004 ; Rannou et Nicolas, 2018).

Une diminution de la précision d'une méthode peut avoir plusieurs origines. Les premières causes sont humaines : une technique de pipetage inexacte, des éclaboussures de réactifs entre les puits, l'assèchement des puits, un cycle de congélation/décongélation non respecté entre les échantillons (Hannon *et al.*, 2004 ; Rannou et Nicolas, 2018). Une augmentation du CV peut être liée également une erreur

de machine : pipettes automatisées non calibrées, lecteurs de plaques non calibrés, réglages inappropriés du logiciel de lecture de plaques pour analyser les échantillons dans les puits. Enfin, la contamination des plaques, des échantillons et des réactifs peut entraîner un biais élevé (Hannon *et al.*, 2004).

3.2.1.1.3 Qualités intrinsèques d'une méthode

La sensibilité d'un test quantitatif est définie comme la plus petite quantité d'antigène non marqué pouvant être distinguée de manière significative de l'absence totale de composé (Hannon *et al.*, 2004).

La spécificité d'un test quantitatif est définie comme l'absence d'interférences avec d'autres substances que la molécule à doser. Pour les tests immunologiques, elle dépend donc de la capacité des immunoglobulines à reconnaître une structure moléculaire donnée sans influence d'autres paramètres (dilution, pH, réactions croisées avec d'autres molécules...) (Hannon *et al.*, 2004 ; Rannou et Nicolas, 2018).

3.2.1.2 Technique de référence du dosage vétérinaire de la progestérone

3.2.1.2.1 Dosage radio-immunologique : un gold-standard dépassé ?

Le dosage radio-immunologique a été longtemps considéré comme le Gold Standard du dosage de la progestérone chez la chienne. Le kit le plus utilisé en médecine vétérinaire est un kit en phase solide d'iode I^{125} Coat-A-Count® (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA). Ce kit spécifique est validé sur sérum pour la chienne en 1991, et sur plasma en 2001, bien que d'autres auteurs rapportent l'utilisation d'autres tests radioimmunologiques chez la chienne auparavant (Srikandakumar *et al.*, 1986 ; Reimers *et al.*, 1991 ; Okkens *et al.*, 2001).

Utilisé longtemps comme dosage de référence pour l'exploration du cycle de la chienne et l'évaluation de performance de kits CLIA, ELISA, ELFA ou LC-MS, son utilisation est désormais limitée à la recherche. En effet la réglementation a évolué et est désormais plus stricte : la détention et l'utilisation de radio-isotopes sont soumises à une autorisation préalable délivrée par l'ASN. Seuls certains laboratoires de recherche possédant l'accréditation nécessaire continuent à l'utiliser à l'aide d'un personnel qualifié. Son utilisation est en déclin depuis les années 2010 avec la validation d'autres techniques plus commodes comme la CLIA (Niewiadomska et Fontbonne, 2020). De plus, la production du kit Coat-A-Count® validé originellement est arrêtée en 2014 nécessitant la recherche d'un nouveau gold-standard (Nöthling et De Cramer, 2018).

3.2.1.2.2 Dosage LC-MS : une nouvelle technique de référence

Depuis 2007, la technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) pour le dosage des hormones stéroïdiennes est considérée la technique de référence en médecine humaine. Elle est de plus en plus fréquemment utilisée en biologie vétérinaire comme méthode de référence et s'inscrit progressivement depuis une dizaine d'années comme la remplaçante de la RIA. Les automates pouvant réaliser des dosages LC-MS restent la possession de laboratoires

de recherche spécialisés et ne sont pas largement accessibles en clinique vétérinaire. La validation de nouveaux automates est désormais comparée aux dosages réalisés par LC-MS (Rota *et al.*, 2016 ; Bilbrough et Glavan, 2019).

3.2.2 Étude de la performance des automates CLIA pour le dosage de la progestérone

3.2.2.1 Présentation des systèmes de dosage CLIA accessibles en France

Il existe trois kits CLIA de laboratoire validés pour le dosage de la progestérone chez la chienne. Ils sont lisibles sur trois automates prioritairement utilisés en Europe. Il s'agit des appareils Immulite 1000 et 2000®, Access 2® et du Cobas® pour le système Elecsys.

3.2.2.1.1 Systèmes Immulite® (Siemens Healthcare Diagnostics, Californie)

Les kits CLIA de dosage de la progestérone les plus fréquemment utilisés sont lus sur les analyseurs Immulite 1000 et 2000, des laboratoires Siemens Healthcare Diagnostics en Californie. Ce sont des analyseurs de gros volumes, comme le montrent les figures 26 et 27 ci-dessous. Ils réalisent de manière automatisée des immuno-dosages chimiluminescents. Le laboratoire a développé quelques kits d'endocrinologie à destination des vétérinaires, mais ceux qui permettent de doser la progestérone chez la chienne sont des kits humains. Ils ont été validés sur l'Immulite pour la chienne en 2003 (Kutzler *et al.*, 2003).

L'Immulite 1000 est l'analyseur le plus ancien et le plus largement utilisé. Sa commercialisation est à ce jour arrêtée aux États-Unis et il est progressivement remplacé par l'Immulite 2000 plus performant (SIEMENS Healthineers, 2021) . Les kits pour la progestérone utilisés sont des kits humains : le LKPG1 avant 2012 et le LKPW1 à ce jour pour l'Immulite 1000. Le kit pour l'Immulite 2000 est le L2KPW2 (200 tests) ou L2KPW6 (600 tests) (SIEMENS Healthineers, 2021). Ils sont à ce jour les kits de laboratoire CLIA et les analyseurs les plus largement utilisés.

Figure 26 : Analyseur Immulite 1000, (Siemens Healthineers, 2021)



Chaque kit de dosage CLIA contient au moins une cartouche de 200 billes revêtues d'un anticorps polyclonal de lapin anti-progestérone correspondant à la phase solide, une cartouche à réactif de progestérone marquée à la phosphatase alcaline correspondant à l'antigène compétitif associé à l'enzyme, et deux flacons d'ajusteur de progestérone aux concentrations hautes et basses pour calibrer l'analyseur. Le reste du matériel nécessaire (comme le substrat chimiluminescent) est fourni séparément (Siemens Healthcare Diagnostics, 2013).

Figure 27 : Analyseur Immulite 2000, (Siemens Healthcare Diagnostics, 2013)



3.2.2.1.2 Système Access 2 (Beckman Coulter, Californie, USA)

Le second système CLIA validé pour le dosage de la progestérone chez la chienne en 2012 utilise également des kits à usage humain : l'Access Progesterone II. Le dosage est réalisé sur l'analyseur Access 2® des laboratoires Beckman et Coulter, visible d'après la figure 28 ci-dessous (Monino *et al.*, 2012)

Figure 28 : Automate CLIA Access 2®, (Beckman Coulter Inc., 2021)



Le kit Access Progesterone fonctionne en ajoutant l'échantillon à une cuvette réactionnelle avec de l'anticorps de lapin contre la progestérone, ainsi qu'un conjugué phosphatase alcaline/progestérone. Enfin, des particules paramagnétiques recouvertes d'anticorps de capture de chèvre anti-lapin sont introduites. La progestérone dans l'échantillon entre en compétition avec le conjugué phosphatase alcaline/progestérone pour les sites de liaison sur une quantité limitée d'anticorps anti-progestérone spécifique. Les complexes antigène-anticorps restant se lient aux anticorps capturés sur la phase solide. Puis après rinçage, seuls subsistent les éléments liés à la phase solide retenus dans un champ magnétique. Après révélation par le substrat luminescent, l'analyseur calcule la concentration de l'échantillon, inversement proportionnelle à l'intensité lumineuse émise (Beckman Coulter Inc., 2020).

3.2.2.1.3 Système Elecsys® (Roche Diagnostics, Allemagne)

Le troisième système d'analyse CLIA utilisé pour le dosage de la progestérone de la chienne est le système Elecsys lu sur les automates Cobas® du laboratoire Roche Diagnostics. Le système validé en 2020 pour la progestérone chez la chienne correspond au kit CLIA Elecsys Progesterone II lisible sur la partie Cobas e 601 appartenant plus largement au système automatisé Cobas 6000. Cet analyseur est visible sur la figure 29 ci-dessous. Plus de 600 automates Cobas 6000 sont utilisés en France (Tal *et al.*, 2020).

Le kit utilisé est le kit Progesterone II. On introduit l'échantillon dans une solution contenant un anticorps monoclonal biotinylé spécifique de la progestérone et un dérivé de progestérone marqué au complexe de ruthénium (le luminophore). Le tout est incubé dans du danazol pour libérer la progestérone de l'échantillon. Cette dernière entre en compétition avec le dérivé de progestérone marqué pour le site de liaison de l'anticorps biotinylé. Après l'ajout de microparticules recouvertes de streptavidine, les complexes se lient à la phase solide via l'interaction de la biotine et de la streptavidine. Après rinçage, un champ électrique est transmis à la solution initiant la réaction chimique. L'éclair lumineux produit par la réaction de chimiluminescence est ensuite capté et interprété (Roche Diagnostics, 2016).

Figure 29 : Analyseur Cobas 6000, (Roche Diagnostics, 2016)



3.2.2.2 Performance de l'Immulite

Les dosages CLIA sur Immulite pour la progestérone de la chienne sont réalisés sur sérum ou plasma. De nombreuses études ont comparé les performances de l'Immulite par rapport à d'autres méthodes de référence. Les résultats actuels sont contradictoires mais une différence pourrait exister entre les valeurs de progestéronémie plasmatique et sérique. Ce point est abordé dans la partie 3.2.6.2.

3.2.2.2.1 Performance du test Immulite 1000 initial sur sérum

La plus ancienne des études porte sur le kit de lecture de progestérone sur Immulite 1000. L'équipe de Kutzler (Kutzler *et al.*, 2003) à l'université de Cornell souhaitait valider le dosage Immulite 1000 tout en évaluant si les valeurs de progestérone sérique obtenues par CLIA pouvaient aider à la prédiction de la date de parturition, en fonction du premier jour de hausse pré-lutéinisatoire de progestérone. Comme vu précédemment, la hausse pré-lutéinisatoire de progestérone survient préalablement au pic de LH. Ils ont donc comparé les mêmes échantillons de sérum de chiennes dosés par une technique RIA et la technique Immulite.

Les deux dosages ne présentent dans un premier temps pas le même intervalle de détection. La méthode CLIA est moins sensible que la RIA avec une limite de détection de 0,2 ng/ml contre 0,02 ng/ml. Les auteurs ont pu dans un second temps construire un modèle linéaire satisfaisant avec un coefficient de corrélation élevé pour 72 échantillons ($r^2 = 0,975$), malgré la présence d'un biais constant (-0,16 ng/ml) et une pente de 0,951. Les coefficients de variations inter-essai de la méthode CLIA ont été évalués pour deux groupes de concentration différentes : ils étaient de 11,9 et 6,7% pour respectivement des échantillons de 0,96 ng/ml et 9,52 ng/ml. Le coefficient intra-essai était de 11% pour des concentrations comprises entre 1 et 2 ng/ml.

L'étude est la première à montrer que la méthode CLIA est utilisable pour le dosage de la progestérone sérique chez la chienne. De plus, sa précision est meilleure en intra-essai pour des valeurs pré-lutéinisatoires de progestérone que la méthode RIA, bien qu'ayant une précision inter-essai moins élevée. Les résultats de cette étude pour la méthode CLIA sont corrélés de manière satisfaisante aux résultats de la méthode de référence et les auteurs ne rapportent pas de différence significative entre les deux méthodes (Kutzler *et al.*, 2003).

Trois ans ultérieurement, une autre étude a quant à elle montré une différence significative entre les valeurs de progestérone sérique dosée par RIA et CLIA. En effet, les auteurs ont mis en évidence que les résultats donnés par la RIA étaient 1,5 fois plus élevés que ceux donnés par la CLIA sur Immulite 1000. Les résultats trouvés par les deux techniques étaient cependant toujours en bonne corrélation linéaire donc de précision suffisante (coefficient de corrélation linéaire $r^2 = 0,9709$) (Volkman, 2006).

Une étude deux ans plus tard est la seule à avoir inversement montré des valeurs de progestérone sérique données par Immulite 1000 significativement plus élevées que par RIA. Les auteurs ont calculé une différence en moyenne de 0,69 ng/ml sur des échantillons sériques dosés par les deux méthodes. Ils expliquent cette différence en suspectant une meilleure sensibilité de la technique Immulite. La corrélation linéaire des deux méthodes reste tout de même excellente avec un coefficient de corrélation de Pearson de 0,99. Les auteurs déclarent que le dosage

CLIA est parfaitement fiable et une alternative aux difficultés techniques de la technique RIA (Chapwanya *et al.*, 2008).

3.2.2.2 Performance du test Immulite 1000 modifié sur sérum

Depuis ces études, le test Immulite sur analyseur 1000 préalablement utilisé a été modifié. Une étude a montré que les valeurs de référence d'ovulation du test modifié sont plus basses que les anciennes et nécessitent la modification de l'intervalle de référence du dosage pour la détermination de l'ovulation. Ce nouvel intervalle de référence du test concorde d'avantage avec les valeurs préalablement mises en évidence par d'autres auteurs concernant le cycle de la chienne (Fontbonne, 2008 ; Schmicke *et al.*, 2016 ; Nöthling et De Cramer, 2018).

Nöthling et De Cramer ont étudié la concordance de ce test modifié avec la technique RIA. Dans cette étude, la progestérone a été dosée sur plasma pour la technique RIA et sur sérum pour l'Immulite. Les valeurs recherchées par les auteurs étaient les valeurs typiques de l'ovulation. La précision de la CLIA était bonne (CV intra-essai de 6,7% / CV inter-essai de 9,16%) mais moins élevée que la RIA (Nöthling et De Cramer, 2018).

Les valeurs de CLIA étaient en moyenne 15% inférieures à la RIA dans l'intervalle d'étude compris entre 0,16 ng/mL et 7,85 ng/mL. Ils ont observé une grande dispersion autour de cette moyenne, avec un intervalle de confiance pouvant varier de 28 % autour de la moyenne. Cette variabilité met en évidence qu'on ne doit pas considérer une valeur de progestérone obtenue isolément mais à la lumière d'autres résultats historiques, cliniques et biologiques relatifs à la chienne. De plus, des différences de 11 à 31 % sont observées dans 25 % des répétitions du même test. Cela suggère que pour améliorer la précision des analyses, les échantillons doivent être analysés au moins deux fois (Nöthling et De Cramer, 2018).

Les mêmes auteurs ont souhaité comparer l'utilisation du test Immulite à celle de la RIA pour identifier les étapes importantes du cycle œstral. La date à laquelle la progestérone devient supérieure à 1,9 ng/ml (6 nmol/L dans l'étude) par RIA correspond en moyenne au jour de survenue du pic de LH (ou un jour auparavant). De même, lorsqu'elle devient supérieure à 5 ng/ml (16 nmol/L) par RIA cela correspond en moyenne au jour d'ovulation. L'étude a cherché à trouver une concordance entre CLIA et RIA pour l'appréciation clinique de ces deux datations primordiales.

Ils ont montré que le jour à partir duquel la P4 dosée par RIA devient supérieure à 1,9 ng/ml, concorde avec le jour (à plus ou moins 24 heures) à partir duquel la P4 dosée par CLIA est supérieure à 1,62 ng/ml (soit 5,1 nmol/L dans l'étude). De même, le jour d'ovulation défini par RIA (P4 > 5ng/ml) est le même que le jour (à plus ou moins 24 heures) à partir duquel le dosage de P4 par CLIA dépasse 4,32 ng/ml (13,6 nmol/L).

Dans cette étude, la précision du dosage CLIA est meilleure à des concentrations basses de progestérone par rapport à la RIA. La technique Immulite possède d'après cette étude une précision semblable pour la décision clinique à la technique RIA pour ces applications. Le vétérinaire peut définir ainsi les étapes importantes du cycle œstral. L'utilisation de l'immunodosage par chimioluminescence Immulite® 1000 LKPW1 au lieu du radio-immunodosage Coat-A-Count® pour déterminer la concentration de progestérone dans le sérum ou le plasma des chiennes nécessite tout de même une révision des concentrations cibles associées aux événements critiques de l'œstrus (Nöthling et De Cramer, 2019).

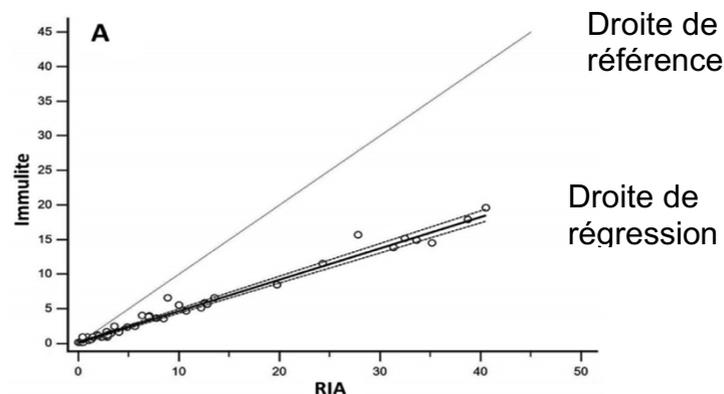
3.2.2.2.3 Performance du test Immulite 2000 sur sérum et plasma

La technique Immulite 2000 est plus récente et a été éprouvée plus récemment pour le dosage de la progestérone. L'équipe de Gloria a montré une excellente précision et exactitude des résultats sur plasma par rapport à la technique RIA. Il y avait en effet une forte corrélation (coefficient de corrélation de Pearson = 0,978) et une concordance excellente (coefficient de concordance de Lin = 0,966) entre les valeurs obtenues par CLIA et RIA. Enfin la précision intrinsèque du test CLIA est bonne, avec un CV intra-essai à 7,4% (Gloria *et al.*, 2018).

Cette étude statistique montre que le dosage Immulite 2000 est excellent, et peut donc remplacer le dosage RIA, malgré des valeurs de CLIA supérieures à la RIA. De plus la limite de détection du dosage de progestérone par Immulite 2000 est meilleure que pour l'Immulite 1000 à 0,1 ng/ml (Gloria *et al.*, 2018).

Une étude réalisée l'année dernière par l'équipe de Tal a également comparé les concentrations de progestérone sérique dosées par RIA et par deux systèmes CLIA, dont l'Immulite 2000 (Tal *et al.*, 2020). La régression de Passing-Bablok utilisée pour comparer les deux séries de mesure (RIA et Immulite 2000) est présentée ci-dessous sur la figure 30. Elle montre dans ce cas une bonne corrélation mais un écart par rapport à la droite de référence. Cela indique que malgré une bonne corrélation, l'exactitude des mesures Immulite dans cette étude n'est pas suffisante par rapport à la RIA. De plus, pour une gamme de concentration de progestérone >5 ng/mL, les résultats de l'Immulite différaient des résultats RIA, d'en moyenne 7 ng/ml. Pour des gammes de progestérone de concentration plus basses, il n'y avait cependant pas de différence significative. L'ovulation se produisant lorsque la concentration de progestérone dosée par RIA est d'environ 5 ng/mL, le résultat de l'Immulite peut être à cette concentration faussement bas et on peut avoir un biais proportionnel statistique. Les auteurs rapportent que cela pourrait induire en erreur la prise de décision clinique concernant le moment de la reproduction ou de l'insémination. Ces observations font écho à la dernière étude que nous avons analysée concernant l'Immulite 1000, nécessitant un ajustement des intervalles de référence pour la prise de décision clinique (Tal *et al.*, 2020).

Figure 30 : Régression de Passing-Bablok représentant 48 mesures de progestérone par l'Immulite 2000 en fonction de celles dosées par RIA, (Tal *et al.* 2020)



Sur cette figure on observe que les points sont proches de la droite de régression de Passing Bablock révélant une excellente corrélation. Ils sont en revanche éloignés de la droite de référence, révélant une diminution de l'exactitude.

3.2.2.2.4 Performances comparées de l'Immulite 1000 et 2000 sur sérum

Une étude réalisée pour le laboratoire Idexx a comparé les dosages Immulite 1000 et Immulite 2000 sur sérum à la technique de référence LC-MS sur plasma. La régression linéaire des mesures par Immulite 1000 comparées à la LC-MS montre une excellente corrélation, avec une pente et un biais constant excellents. En revanche, malgré une excellente corrélation, l'Immulite 2000 présente un biais proportionnel marqué avec une pente de 0,75 et un biais constant de 0,17 ng/ml par rapport à la LC-MS. La précision de l'Immulite 2000 par rapport à la LC-MS est donc excellente, mais l'exactitude par rapport à cette dernière est diminuée par rapport à l'Immulite 1000. Pour les auteurs, cela nécessite un ajustement des valeurs de référence pour l'évaluation des étapes du cycle de la chienne lors de l'utilisation de l'Immulite 2000, mais pas pour l'Immulite 1000 (Bilbrough et Glavan, 2019).

En conclusion, les deux Immulite présentent une excellente corrélation avec le dosage RIA et LC-MS. Il semble que l'Immulite 1000 présente une meilleure concordance que l'Immulite 2000. Cependant, les auteurs précisent que pour chacun des dosages, il s'agit de prêter une attention particulière aux valeurs seuils définies par RIA qui ne sont pas forcément les mêmes que pour l'Immulite. Ils incitent à l'interprétation prudente des événements et de les analyser dans un contexte clinique.

3.2.2.3 Performance de l'Access 2

Les performances de l'Access 2 n'ont à notre connaissance pas été évaluées par rapport aux méthodes de référence (RIA et LC-MS) pour le dosage de la progestérone chez la chienne. Elles ont cependant été analysées en tant que valeur de référence par rapport à une méthode FEIA. Nous décrivons cette étude dans la partie 3.1.3.3 ci-dessous (Monino *et al.*, 2012).

3.2.2.4 Performance de l'Elecsys sur sérum

Les performances de l'Elecsys ont été évaluées à deux reprises. Dans une première étude, 88 échantillons de sérum canin ont été dosés par RIA et Elecsys (Lee *et al.*, 2017). Les résultats ont montré une très bonne corrélation des deux méthodes à faible concentration ($P4 < 1 \text{ ng/ml}$). Cependant, cette corrélation diminue fortement à des concentrations élevées ($P4 > 4 \text{ ng/ml}$). De plus, les concentrations de progestérone déterminées par le dosage Elecsys étaient systématiquement supérieures à celles mesurées par RIA pour des concentrations supérieures à 3 ng/ml.

Les auteurs rapportent l'utilisation d'une unique solution d'étalonnage pour le contrôle de qualité des analyses Elecsys. Par conséquent, la différence entre RIA et Elecsys pourrait résulter de méthodes d'étalonnage différentes.

Les auteurs concluent pourtant que d'après leurs données, la méthode Elecsys reste assez fiable et constitue une bonne alternative à la méthode RIA (Lee *et al.*, 2017).

L'étude de Tal et ses co-auteurs a quant à elle prouvé une meilleure corrélation à la méthode de référence pour l'Elecsys par rapport à l'Immulite, pour des valeurs de progestérone sériques supérieures à 5 ng/ml (Tal *et al.*, 2020).

Les auteurs de ces deux études considèrent qu'il est vraisemblablement acceptable d'utiliser la méthode Elecsys pour une application clinique chez la chienne. Les dosages CLIA représentent donc une excellente alternative aux dosages de références RIA et LC-MS. Devant le manque de disponibilité de RIA ou LC-MS, ils sont donc très indiqués en remplacement pour un dosage précis de la progestérone.

3.2.3 Étude de la performance des automates ELFA et FEIA pour le dosage de la progestérone

3.2.3.1 Description des automates accessibles en France

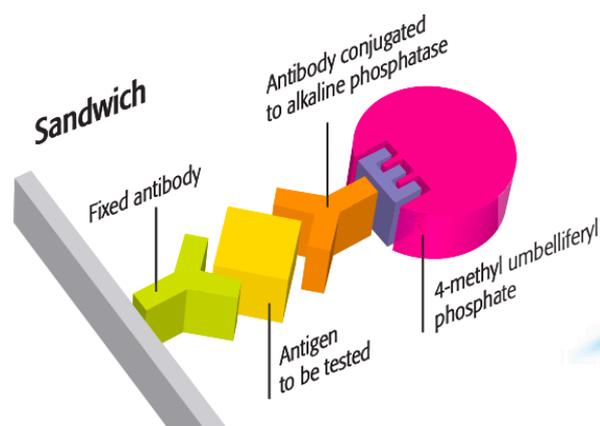
Il existe trois automates qui font intervenir des dosages immuno-enzymatiques avec fluorescence en France.

3.2.3.1.1 Système ELFA sur sérum et plasma : Mini Vidas® (Biomérieux, France)

Un des systèmes immuno-enzymatiques fluorescents fréquemment utilisé pour le dosage de la progestérone est le système VIDAS® Progesterone. Développé par le laboratoire Biomérieux, des kits spécialement à destination vétérinaires pour le dosage de la progestérone sont lus par deux appareils.

Les tests pour la progestérone sont réalisés sur une phase solide contenant l'anticorps anti-progestérone et font intervenir un dosage sandwich comme observé sur la figure 31 ci-dessous. L'enzyme de révélation est la phosphatase alcaline et le composé fluorogénique est le 4-méthylumbelliferyl phosphate.

Figure 31 : Mécanisme du dosage ELFA Vidas®, (Biomérieux, 2018)



L'automate Mini Vidas® (visible sur la figure 32 ci-dessous), réalise automatiquement les étapes de lavages, ajout de substrat, révélation fluorométrique et calcul de la concentration (à partir d'une courbe standard préalablement réalisée). Il est très utilisé en France pour la biologie animale car il existe de nombreux tests vétérinaires utilisant cette technique ELFA à disposition (Biomérieux, 2018). Il est validé pour l'utilisation vétérinaire en 2011 (Brugger *et al.*, 2011).

Figure 32 : Automate mini Vidas®, (Biomérieux, 2018)



3.2.3.1.2 Système FEIA sur sérum : AIA360 (TOSOH Bioscience, Japon)

Les systèmes AIA®, mis au point par le laboratoire TOSOH Bioscience au Japon sont distribués en France par le groupement Kitvia. Des tests pour la progestérone sont validés pour l'usage vétérinaire comme le AIA PACK PROG II®, lisible sur les automates AIA360® (visible sur la figure 33 ci-dessous). Il est validé pour la première fois en 2012 (Monino *et al.*, 2012).

Contrairement au système mini-Vidas, le dosage de la progestérone fait ici appel à un dosage par compétition. La progestérone de l'échantillon rentre en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps anti-progestérone fixé sur la phase solide avec de la progestérone marquée. Le composé fluorogénique utilisé est le 4-méthylumbelliferyl phosphate (Tosoh Bioscience Inc., 2021).

Figure 33 : Automate AIA360®, (Tosoh Bioscience Inc., 2021)



3.2.3.1.3 Système ELFA sur sérum : Vcheck® ou Kimmuno1® (Kitvia)

Le groupement Kitvia propose également aux vétérinaires un dosage ELFA sur sérum réalisés par un automate nommé VCheck®. Les performances de cet analyseur n'ont à notre connaissance pas encore été établies et étudiées par rapport aux valeurs de référence et à d'autres dosages présents sur le marché.

3.2.3.2 Performance du Mini Vidas

Une étude conduite par Brugger a testé la corrélation du test ELFA Mini Vidas par rapport à un dosage radio-immunologique pour la progestérone sérique de la chienne (Brugger *et al.*, 2011). Quinze échantillons de sérum ont été comparés pour une gamme de concentration s'étalant de 0,3 à 40.0 ng/ml. Les chercheurs ont trouvé grande corrélation entre les valeurs du mini Vidas et de RIA, à une exception près, avec un écart moyen de 0,15% par rapport à la pente. Le coefficient de corrélation est excellent après régression de Passing-Bablok (0,995).

Pour des valeurs de progestérone allant de 6,8 ng/ml à 61,8 ng/ml, le coefficient de variation intra-essai du Mini Vidas varie entre 6,6 % et 2,6 %. Ces valeurs sont très bonnes. Cependant le CV intra-essai pour des valeurs de progestérone de 1,1 ng/ml était de 25,4%.

Lorsque la concentration de P4 pendant le proœstrus et l'œstrus de sept chiennes a été mesurée par le système Mini Vidas, l'augmentation de la P4 au-dessus de 5 ng/ml (indiquant l'ovulation) concordait avec les données cliniques de toutes les chiennes. Des échantillons de sang de neuf chiennes gestantes ont été prélevés quotidiennement, à partir de 3 à 6 jours avant le jour calculé de la parturition. Les concentrations de P4, mesurées par Mini Vidas, ont diminué un jour avant la parturition. La valeur moyenne de P4 était de 7,8 ng/ml deux jours avant la parturition et a diminué pour atteindre une moyenne de 2,0 ng/ml.

Les auteurs considèrent que le système Mini Vidas fournit des résultats quantitatifs rapides et fiables par rapport à la technique RIA qui peuvent être immédiatement mis en correspondance avec les résultats de l'examen clinique. Les concentrations basses auraient une moins bonne répétabilité mais l'appareil détecte tout de même les variations de progestérone nécessaires à la prise de décision clinique pour l'insémination ou la détection du terme (Brugger *et al.*, 2011).

3.2.3.3 Performance du AIA360

Une première étude dirigée par Monino a souhaité comparer dans l'espèce canine la précision de la progestérone sérique détectée par la technique FEIA (AIA®-360) à une technique par chimiluminescence (Access®2), plus facile d'accès que les dosages de référence établis (RIA et LC-MS) (Monino *et al.*, 2012).

Les résultats rapportent un très haut niveau de corrélation entre FEIA et CLIA ($r^2=0.978$) pour des valeurs de progestérone sériques s'étalant entre 0,25 et 30.75 ng/ml. Pour les auteurs, le chevauchement des résultats de progestérone obtenus avec les deux techniques indique qu'elles sont interchangeables. De plus, la reproductibilité intra-essai testée sur quatre échantillons (valeurs moyennes de 0,62, 2,66, 12,16 et 23,6 ng/ml) a montré de faibles coefficients de variation dans les 5 répétitions (CV= 6,67%, 2,58%, 4,62% et 2,01%, respectivement), confirmant la grande précision des résultats. Cette reproductibilité intra-essai est meilleure dans cette étude que pour le Mini Vidas pour des valeurs de progestérone faible. La bonne

reproductibilité intra-essai valide la fiabilité de la technique à différents stades du cycle œstral canin.

La variabilité inter-essai sur cinq échantillons de sérum (valeur moyenne 0,25, 2,82, 10,13, 24,87 et 30,74 ng/ml) provenant de différentes chiennes a été analysée individuellement dans 10 séries séparées et a démontré un coefficient de variabilité de 15,88%, 7,21%, 6,04%, 5,8% et 5,09% respectivement. Ces résultats indiquent la grande précision de la technique pour déterminer la concentration de progestérone, quelle que soit la valeur de l'échantillon, le délai entre le prélèvement et le test, et le lot utilisé pour des valeurs supérieures à 2,82 ng/ml. Cette reproductibilité inter-essai est plus faible cependant pour des valeurs basses.

La grande concordance clinique et statistique entre FEIA et CLIA, la reproductibilité (intra-essai), la faible variabilité des résultats dans le temps (inter-essai) confirme selon les auteurs l'admissibilité de la méthode AIA360® en tant qu'alternative valable à des équipements plus coûteux (Monino *et al.*, 2012).

Une seconde étude plus récente conduite par Rota a souhaité comparer la méthode FEIA AIA360® avec la technique de référence LC-MS et évaluer si l'estimation de la date de parturition par la méthode FEIA était satisfaisante pour l'utilisation clinique (Rota *et al.*, 2016). La corrélation entre FEIA et LC/MS/MS, évaluée sur 19 échantillons de sérum, était statistiquement significative ($R^2 = 95,7\%$, $p < 0,001$), bien que FEIA ait montré des valeurs significativement plus élevées que la LC/MS. Dans les différentes phases du cycle œstral, déterminées par cytologie vaginale, les concentrations de P4 (par FEIA) étaient statistiquement différentes : $0,38 \pm 0,14$ ng/ml en moyenne pour l'anœstrus, $1,04 \pm 0,67$ ng/ml en moyenne pour le proœstrus et $6,8 \pm 7,26$ ng/ml en moyenne pour l'œstrus. En conclusion, la méthode FEIA utilisée peut être considérée comme fiable en ajustant les intervalles diagnostiques de progestérone d'intérêt (Rota *et al.*, 2016).

Les dosages FEIA représentent ainsi une alternative très fiable à la CLIA pour un dosage précis de la progestérone. Les valeurs de progestérone de faible concentration sont cependant moins précises que les méthodes de référence et que les analyseurs de CLIA.

3.2.4 Étude de la performance des automates par fluorescence améliorée pour le dosage de la progestérone

3.2.4.1 Description des systèmes mis sur le marché

3.2.4.1.1 Système SPFS sur sérum et plasma : DRI-CHEM AU10V (Fujifilm Holdings Corporation, Japon)

Il existe un système appelé Progestérone v-PRG à disposition vétérinaire utilisant un dosage par plasmon de surface amélioré par fluorescence pour le dosage de la progestérone chez la chienne. Lisible sur l'automate Fuji DRI-CHEM IMMUNO AU10V visible sur la figure 34 ci-dessous, ce test est récemment introduit sur le marché vétérinaire français. Il est réalisable sur sérum et plasma et a l'avantage de ne pas présenter d'étape de lavage, garantissant une plus grande rapidité d'obtention des résultats. Il permet le dosage de la progestéronémie sur sérum et plasma (Fontbonne *et al.*, 2021).

Figure 34 : Automate FUJI DRI CHEM Immuno AU-10V (Fujifilm, 2018)



Le test est un test compétitif. La progestérone de l'échantillon est mélangée au départ dans une solution contenant des anticorps anti-progestérone marqués par des perles de fluorescence. Puis la solution est mise en contact avec la phase solide : de la progestérone marquée par phosphatase alcaline, fixée sur une fine couche d'or. Les anticorps encore disponibles se fixent alors sur la phase solide. Un éclair lumineux active les perles de fluorescence. La fluorescence mesurée est inversement proportionnelle à la quantité de progestérone dans l'échantillon (Fujifilm, 2018).

3.2.4.1.2 Système LIF sur sérum et plasma, Speed Progesterone (Virbac, France)

Le laboratoire Virbac propose deux solutions pour le dosage de la progestérone chez la chienne. Un dosage semi-quantitatif ELISA, disponible sur le marché depuis de nombreuses années vu dans la partie 3.3.5. ci-dessous. Il a récemment mis au point un dosage quantitatif lu sur un automate nommé Speed Reader® visible sur la figure 35 ci-dessous utilisant la technique de fluorescence améliorée par laser associé à une première étape d'immunochromatographie. Ce kit de dosage est mis sur le marché en 2017.

Figure 35 : Automate Speed Reader®, (Virbac BVT, 2017)



Le principe est assez simple, l'échantillon est d'abord déposé sur une surface de chromatographie sur laquelle sont déposés des anticorps de capture anti-progestérone couplés à des nanoparticules fluorescentes. Après migration, l'automate émet un laser permettant d'amplifier le signal fluorescent des nanoparticules. Une lecture de l'intensité de la fluorescence est réalisée par l'automate qui en déduit ensuite la concentration (BVT Virbac, 2017).

3.2.4.2 Performance du DRI-CHEM AU10V®

Une étude conduite par Fontbonne et al, porte sur la validation de ce nouvel automate pour la progestérone de la chienne. Les auteurs ont comparé les performances SPFS de l'AU10V par rapport au dosage CLIA par Immulite 2000. Les deux tests présentent les mêmes limites de détection de 0,20 à 40,0 ng/ml. Deux types de prélèvements sont testés : plasma et sérum (Fontbonne *et al.*, 2021).

Les auteurs rapportent que les concentrations de P4 mesurées par SPFS et CLIA étaient fortement corrélées (sérum, $r = 0,966$; plasma, $r = 0,968$). Les concentrations sériques de progestérone mesurées par SPFS ont été évaluées pour différents stades. Les concentrations en proœstrus étaient de 0,42 à 1,46 ng/ml ; au moment de l'ovulation de 3,69 à 7,85 ng/ml, pendant la gestation de 11,73 à 28,24 ng/ml et en prépartum de 1,54 à 3,22 ng/ml. Le nombre d'échantillons utilisés pour chacun des intervalles était conséquent.

Les résultats de cette étude relatent que la SPFS est un test fiable par rapport à la CLIA pour déterminer les concentrations de P4 sur toute la gamme de concentrations et quel que soit le type de prélèvement (sérum ou plasma). Le plasma hépariné présentait cependant des concentrations de P4 plus faibles, quel que soit le

dosage. Compte tenu des différences observées dans les concentrations de P4 entre les échantillons de sérum et de plasma, les vétérinaires doivent essayer d'utiliser les mêmes tubes de prélèvement sanguin et, par conséquent, le même type d'échantillon pour un patient spécifique (Fontbonne *et al.*, 2021).

3.2.4.3 Performance du Speed Progesterone®

Une étude récente a comparé le test Speed Progesterone® avec le test CLIA Elecsys. Elle a montré une bonne corrélation des valeurs d'ovulation pour une vingtaine de chienne entre les deux appareils ($R^2 = 0,9015$). Cette étude n'a cependant pas été conduite sur d'autres valeurs au cours du cycle (Maenhoudt *et al.*, 2017).

Une seconde étude, interne et non publiée, a montré une corrélation satisfaisante avec une méthode CLIA de contrôle ($R^2 = 0,9338$). Cependant nous ne disposons pas des données de l'étude et la courbe mise à disposition par la brochure d'après la figure 36 ci-dessous montre une grande disparité des valeurs autour de la droite de corrélation (BVT Virbac, 2017).

Figure 36 : Courbe de corrélation linéaire de comparaison entre le Speed Progesterone (Virbac) et une méthode CLIA de référence inconnue, (n=165), (BVT Virbac, 2017)



La courbe montre une certaine dispersion des valeurs (points bleus) autour de la droite de corrélation en bleu foncé, diminuant ainsi la corrélation. Ces résultats ne sont pas des résultats publiés.

Les techniques par fluorescence améliorée semblent être des alternatives relativement fiables aux autres méthodes de CLIA. Cependant, ces techniques étant relativement récemment développées pour le dosage de la progestérone, peu d'études ont encore été réalisées pour évaluer leur performance. Les premiers résultats d'étude en cours semblent toutefois prometteurs pour ces analyseurs à disposition *in situ* en clinique.

3.2.5 Étude de la performance des techniques ELISA pour le dosage de la progestérone

Il existe de nombreuses techniques ELISA utilisées pour le dosage de la progestérone chez la chienne. Nous allons dans cette partie nous focaliser sur les performances des dosages les plus accessibles en France.

3.2.5.1 Description des techniques

Les premières techniques ELISA développées pour le dosage de la P4 sont validées depuis une trentaine d'années pour la chienne. Les kits les plus répandus sur le marché français sont issus du laboratoire Biovet® et distribués par Kitvia®. Il s'agit de deux tests : le premier est un dosage quantitatif appelé OVUCHECK Plasma® et le second un kit semi-quantitatif appelé OVUCHECK Premate®. Le laboratoire Virbac présent sur le marché français a également développé un test semi-quantitatif appelé Ovulation Test®, validé pour le dosage de la progestérone chez la chienne (England *et al.*, 1989).

Idexx® a récemment développé un dosage ELISA quantitatif pour son appareil de biochimie vétérinaire Catalyst. D'autres kits ELISA quantitatifs validés sont développés dans d'autres pays (Royaume-Uni et Allemagne) comme le dosage MiniReader® issu du laboratoire Minitüb GmbH (Allemagne) (Bilbrough et Glavan, 2019).

3.2.5.1.1 Dosages Ovucheck® (Biovét Inc, Canada)

3.2.5.1.1.1 Dosage quantitatif sur sérum et plasma : Ovucheck Plasma®

Le dosage Ovucheck Plasma est un test utilisable pour les bovins et pour les chiennes sur sérum et plasma. La méthode ELISA utilisée est une méthode par compétition. Les résultats sont lus par un spectrophotomètre de poche, l'Ovucheck Reader® à l'aide d'un filtre de 450 nm (vu sur la figure 37 ci-dessous). La détermination de la concentration est réalisée par ce même appareil à l'aide d'une courbe étalon effectuée à chaque dosage à l'aide de quatre solutions de concentrations fixes (Kitvia, 2013).

Figure 37 : Le spectrophotomètre de poche Ovucheck Reader (Kitvia, 2021)



3.2.5.1.1.2 Dosage semi-quantitatif sur sérum et plasma : Ovucheck Premate®

Kitvia a également créé un système de dosage ELISA semi-quantitatif pour la progestérone de la chienne. Le principe a déjà été expliqué précédemment dans la partie 2.2.1.2. Il s'agit d'un dosage par compétition et les informations colorimétriques sont évaluées à l'œil nu par l'opérateur (moins bonne précision avec trois plages de couleur rosées possibles). Il est également possible d'effectuer la mesure et la définition de la plage de concentration par l'Ovucheck Reader. Ce système différencie ainsi trois plages de concentration : les concentrations inférieures à 3 ng/ml, supérieures à 10 ng/ml et comprises entre 3 et 10 ng/ml. L'opérateur lit la différence de couleur par rapport à deux dosages réalisés simultanément à l'aide de deux concentrations de progestérone de référence (3 et 10 ng/ml) mises à disposition dans le kit (Biovet Inc., 2013).

3.2.5.1.2 Dosage semi-quantitatif sur sérum et plasma : Ovulation Test® (Virbac, France)

Un autre dosage semi-quantitatif est disponible sur le marché français. Il s'agit du dosage Ovulation Test®, commercialisé par Virbac. C'est un dosage ELISA par compétition entre la progestérone plasmatique ou sérique et la progestérone liée. La cupule test contient les anticorps anti-progestérone auxquels va se fixer la progestérone de l'échantillon. Après lavage de la cupule, le conjugué contenant la progestérone liée à l'enzyme va se fixer sur les anticorps anti-progestérone restés libres. Après un second lavage, le substrat chromogène est rajouté et colore la solution en bleu. Ce test donne quatre intervalles de concentration en fonction de l'intensité bleutée de la solution. Contrairement à l'Ovucheck Premate, la comparaison visuelle est effectuée avec un nuancier papier fourni dans le kit, pas avec des valeurs de référence de progestérone.

Ce nuancier différencie 4 intervalles : le premier pour des concentrations inférieures à 1 ng/ml, le second pour une P4 comprise entre 1 et 2,5 ng/ml, le troisième pour une P4 comprise entre 2,5 et 8 ng/ml et enfin le dernier pour des concentrations supérieures à 8 ng/ml (BVT Virbac, 2001 ; Leroyer *et al.*, 2002) .

3.2.5.1.3 Dosage quantitatif sur sérum et plasma : Catalyst Progesterone® (Idexx Laboratories, Etats-Unis)

Le laboratoire Idexx a récemment introduit un nouveau dosage ELISA par compétition disponible sur ses analyseurs de biochimie sanguine largement distribués dans les cliniques vétérinaires. Lisible sur les analyseurs Catalyst One® et Catalyst Dx®, le dosage de la progestérone se présente sous forme d'une plaquette unique contenant les réactifs nécessaires au dosage. Ce dosage peut se faire en parallèle d'autres mesures en respectant un certain ordre de plaquettes. Il peut être réalisé sur sérum et plasma (Idexx Laboratories Inc., 2019).

Nous allons dans un premier temps évaluer les performances des dosages quantitatifs par méthode ELISA à usage vétérinaire en France.

3.2.5.2 Performance des techniques ELISA quantitatives

3.2.5.2.1 Performance de l'Ovucheck Plasma®

Mis au point il y a une trentaine d'années, le dosage Ovucheck est validé pour le dosage de la progestérone chez la chienne en 1987. Il est désormais commercialisé par les laboratoires Biovet Inc, et distribué par Kitvia en France. Ses performances ont été évaluées par rapport au dosage RIA pour 64 échantillons. Les auteurs ont pu observer que le dosage ELISA était plus précis pour mesurer la hausse de la progestérone consécutive au pic de LH par rapport à la RIA. Ils indiquent que ce dosage serait donc potentiellement plus précis pour la détection du pic de LH par rapport à la méthode de référence (Bouchard *et al.*, 1991).

L'analyse statistique montre de plus une corrélation satisfaisante entre les deux méthodes. Cette corrélation n'est toutefois pas excellente. Les auteurs valident l'utilisation de ce test pour l'évaluation du cycle de la chienne, mais rapportent toutefois la nécessité d'études évaluant la fertilité des chiennes suivies par dosage ELISA pour confirmer leurs propos. Le domaine d'étude des valeurs des auteurs est de plus relativement faible (entre 0,5 ng/ml et 10 ng/ml) et les concentrations faibles ont été approximées vers 0,5 ng/ml. Ainsi la précision des valeurs de progestérone faible est de ce fait biaisée (Bouchard *et al.*, 1991).

3.2.5.2.2 Performance du Catalyst Progesterone

Une étude récente non publiée menée par Idexx Laboratories a comparé le dosage de leur Catalyst Progesterone au Gold-Standard actuel, le dosage LC-MS. La méthode Catalyst a été évaluée sur une centaine d'échantillons répartis en deux analyses statistiques (n=49 et 52 respectivement) (Bilbrough et Glavan, 2019).

Elles ont montré une corrélation excellente par rapport aux dosages effectués par LC-MS par régression de Passing-Bablok ($r > 0,98$ pour les deux études). Les coefficients de variation calculés pour le dosage Catalyst étaient inférieurs à 10% à faible concentration (1,1 ng/ml environ) et à concentrations moyenne (entre 5,4 et 6 ng/ml). Une des limites majeures de cette étude est le manque de comparaison de la méthode Catalyst à la méthode CLIA Immulite qui est largement utilisée à ce jour et qui a été comparée à de nombreuses autres techniques. En effet, même si la technique LC-MS est définie comme le Gold-Standard actuel, très peu d'études en ont étudié la corrélation et la concordance avec d'autres techniques (Bilbrough et Glavan, 2019).

En conclusion, la méthode Catalyst montre une excellente corrélation avec la méthode LC-MS mais d'autres études indépendantes sont nécessaires pour évaluer sa performance face à d'autres méthodes comme la méthode CLIA. En effet, ici, la CLIA a été évaluée face à la méthode LC-MS mais pas face à la méthode ELISA.

Ces deux techniques ELISA quantitatives sont très accessibles en pratique mais présentent potentiellement de nombreux biais et d'autres études sont nécessaires pour évaluer leur performance. De plus il a été montré que les valeurs quantitatives données par ELISA peuvent être modifiées selon le type de prélèvement utilisé (progestérone sérique supérieure à la progestérone plasmatique) nécessitant une prudence d'interprétation des valeurs (Thuróczy *et al.*, 2003).

3.2.5.3 Performance des techniques semi-quantitatives

Nous avons précédemment étudié les performances rapportées des méthodes ELISA quantitatives pour le dosage de la progestérone chez la chienne. Il s'agit désormais d'évaluer les performances des méthodes semi-quantitatives.

3.2.5.3.1 Performance de l'Ovucheck Premate®

3.2.5.3.1.1 Performance de l'Ovucheck Premate® seul

3.2.5.3.1.1.1 Performance du dosage Premate® pour l'appréciation de la date optimale de fertilité

Une première évaluation des performances du dosage semi-quantitatif Ovucheck Premate® date de 1989. Les auteurs ont montré que les concentrations mesurées par ELISA semi-quantitatif étaient systématiquement corrélées avec celles mesurées par radio-immunoessai. De plus le dosage semi-quantitatif a pu différencier les concentrations faibles et intermédiaires de progestérone. Ainsi, les auteurs ont conclu que combiné à la cytologie vaginale, ce moyen de dosage pouvait être utilisé pour déterminer le moment optimal de l'accouplement (England *et al.*, 1989).

Une étude plus tardive a souhaité déterminer le moment optimal pour l'accouplement de 26 chiennes en mesurant les concentrations de progestérone à l'aide de trois kits de test ELISA (dont le Premate®) et d'un dosage radio-immunologique. Deux observateurs ont évalué simultanément les résultats des tests ELISA. Pour les deux observateurs, le moment optimal pour la saillie, basé sur les concentrations de progestérone mesurées avec les deux tests autres que le Premate®, différait significativement de celui basé sur les concentrations de progestérone mesurées par RIA.

Inversement le moment optimal pour la saillie basé sur le test Ovucheck Premate® ne différait pas significativement de celui basé sur la RIA. Cependant trois chiens sur 14 (21 %) pour l'observateur un et quatre chiens sur 14 (29 %) pour l'observateur deux auraient été saillis un jour différent de celui déterminé sur la base des résultats obtenus avec la RIA, impliquant une variabilité liée à l'observateur et à la technique. D'après les auteurs, les concentrations de progestérone mesurées avec les kits de test ELISA sont trop imprécises pour être utilisées en clinique afin de déterminer le moment optimal de l'accouplement (Van Klaveren *et al.*, 2001).

Une autre étude a quant à elle montré que les résultats fournis par l'Ovucheck Premate® étaient plus élevés que les résultats de RIA de contrôle. Cela implique que la période fertile est trop précocement établie si on utilise uniquement le dosage Premate® pour le suivi de reproduction (Moxon *et al.*, 2010).

3.2.5.3.1.1.2 Performance du dosage Premate® pour l'appréciation de la date de parturition chez la chienne

Le dosage Premate® a été comparé à nouveau à la technique RIA quelques années plus tard pour évaluer ses performances quant à l'approximation de la date de parturition. Les auteurs ont pu montrer que sur 10 femelles gestantes, le dosage

Ovucheck Premate a montré chez 9 d'entre elles une chute du taux de la progestérone le jour avant ou le jour même de parturition. La seule femelle qui n'a pas montré de chute de progestérone avait des taux bas de progestérone (validés par RIA), et le dosage semi-quantitatif reflétait ces taux. Les auteurs en ont conclu que cette méthode pouvait être raisonnablement utilisée pour déterminer avec une précision de 24 heures la mise-bas (England et Verstegen, 1996).

3.2.5.3.1.2 Performance de l'Ovucheck Premate® associé à l'Ovucheck Reader®

L'objectif d'une étude récente était de déterminer la corrélation entre les concentrations en P4 mesurées par l'Ovucheck Premate® aidé par le spectrophotomètre de poche Ovucheck Reader® et par chimiluminescence (Schäfer-Somi *et al.*, 2013 cités par Robin, 2018).

Ils voulaient évaluer la possibilité de se servir de l'Ovucheck Reader® pour faire la différence entre les stades pré et post-ovulatoires chez la chienne. En effet, comme vu précédemment, le test Premate® peut donner des valeurs faussement élevées en période pré-ovulatoires. Sur 60 échantillons de sérum mesurés, les auteurs rapportent une corrélation modérée entre l'Ovucheck Reader® et la chimiluminescence. La sensibilité et la spécificité de l'Ovucheck Reader® était de 0,89 et 0,53. Les auteurs concluent que l'Ovucheck Reader® est un test acceptable pour déterminer si la chienne est en stade pré ou post-ovulatoire, mais qu'il ne devrait cependant pas être utilisé isolément (Schäfer-Somi *et al.*, 2013 cités par Robin, 2018).

3.2.5.3.2 Performance de l'Ovulation Test®

Le dosage Premate® est celui qui a été le plus largement étudié. Les performances de l'Ovulation Test® ont été moins fréquemment évaluées.

3.2.5.3.2.1.1 Performance de l'Ovulation Test® pour l'appréciation de la date de fertilité optimale

Schäfer-Somi, Sontas et Schwendenwein ont présenté en congrès en 2014 leur rapport concernant l'évaluation des performances de l'Ovulation Test™ pour la mesure semi-quantitative de progestérone chez les chiennes en période péri-ovulatoire (Schäfer-Somi *et al.*, 2013 cités par Robin, 2018). L'étude a été menée sur 10 chiennes en proœstrus et en œstrus via des écouvillons vaginaux et une évaluation de la concentration sérique en progestérone, tous les 2 jours, à partir du 5ème jour de pertes sanguines vulvaires. Le taux de P4 était évalué par RIA et l'Ovulation Test™.

Dans la majorité des cas, le moment optimal d'accouplement déterminé par les deux analyses RIA et Ovulation Test® était le même, et l'écart maximal était de 2 jours. Ils en concluent que l'Ovulation Test™ serait un outil utile et efficace pour le suivi des chaleurs et de l'ovulation de la chienne (Schäfer-Somi *et al.*, 2013 cités par Robin, 2018).

3.2.5.3.2.1.2 Performance de l'Ovulation Test® pour l'appréciation de la date de parturition chez la chienne

Une étude menée par Leroyer a comparé les résultats des dosages de progestérone obtenus par méthode RIA et Ovulation Test® dans les 24 heures précédant la mise-bas. Une différence de précision entre les deux techniques est mise en évidence. Le jour de parturition, 100 % des dosages en R.I.A. et 89,5 % (17 chiennes sur 19) de l'Ovulation Test® indiquent un taux basal, c'est-à-dire inférieur à 1 ng/ml. La veille, 81,5 % des dosages RIA et seulement 48,1 % des dosages ELISA indiquent un taux basal. Le dosage RIA est donc bien plus précis que le dosage semi-quantitatif. Les auteurs rapportent de plus des difficultés de lecture entre les deux premiers intervalles de concentration. Selon la luminosité de la pièce, il est délicat de trancher (Leroyer *et al.*, 2002).

De plus, les différentes caractéristiques de l'Ovulation® Test, par comparaison avec la méthode RIA considérée sont assez moyennes, avec une sensibilité de 65,2 % par contre 89,1 % par méthode RIA. Cela tient au fait que le nombre de faux-négatifs par méthode ELISA est très important, principalement la veille de la mise bas. L'Ovulation Test® détecte cependant la majorité des chiennes n'étant pas à terme (94,4 %) et sa valeur prédictive positive est bonne. Ainsi, l'Ovulation Test® peut être utilisé pour exclure une mise bas imminente mais ses résultats doivent être interprétés avec parcimonie (Leroyer *et al.*, 2002).

Les techniques ELISA semi-quantitatives manquent de précision de par leur nature. Il existe de nombreux biais de lecture pouvant générer des erreurs de diagnostic. De plus, leurs intervalles de lecture ne peuvent pas permettre un véritable suivi précis des événements ovariens. Malgré leur praticité, il n'est donc pas recommandé de les utiliser comme seuls indicateurs de mise-bas ou d'ovulation.

3.2.6 Limites d'interprétation des valeurs des automates en pratique

3.2.6.1 Limite d'interprétation des valeurs chiffrées selon les machines

Nous avons vu précédemment les différentes performances des automates à disposition pour le dosage de la progestérone en pratique. Fraser et ses collaborateurs ont présenté en 2015 une comparaison des valeurs de progestérone d'échantillons sanguins de chienne dosés par des automates de même modèle mais issus de différents laboratoires (Fraser *et al.*, 2015 cités par Niewiadomska et Fontbonne, 2020).

Cette étude montre des différences entre les différents analyseurs mais elle met surtout en lumière des différences significatives pour un même prélèvement entre deux analyseurs de même modèle. En effet un dosage de progestérone par RIA de 8,1 ng/ml a été mesuré à la fois à 6,64 et à 12,84 ng/ml sur deux mêmes analyseurs de type ELFA (Mini-Vidas®) (Fraser *et al.*, 2015 cités par Niewiadomska et Fontbonne, 2020). Or, nous avons pu étudier dans la partie 3.2.3.2 que le Mini-Vidas avait une bonne fiabilité par rapport à la technique de référence. Ces différences de valeurs n'incriminent ainsi pas la précision des tests, mais soulignent l'importance des calibrations des appareils dans les résultats chiffrés.

Enfin, les travaux récents de l'équipe de Thuróczy ont pu montrer que les valeurs chiffrées de progestérone étaient différentes selon le procédé de fabrication des types de kit utilisé pour des automates ELISA. Les microplaques lyophilisées donnent par exemple des résultats plus élevés que les microplaques congelées (Thuróczy *et al.*, 2016).

Ainsi, il est important pour l'interprétation des valeurs en clinique que les analyses soient réalisées avec la même calibration d'appareil, aux mêmes kits de dosage et de porter une attention particulière à la cinétique des valeurs chiffrées (Niewiadomska et Fontbonne, 2020).

3.2.6.2 Limite d'interprétation des valeurs selon le type d'échantillon

La calibration des appareils n'est pas la seule source potentielle de variabilité des valeurs chiffrées. En effet certains auteurs rapportent des variations des valeurs de progestérone pour une même chienne selon le type d'échantillon. Les travaux d'England sur les dosages ELISA semi-quantitatifs ont montré que la concentration de progestérone était surestimée dans les échantillons de sang total que dans les échantillons de plasma (England, 1991).

Les travaux de l'équipe de Thuróczy ont montré des valeurs de concentration de progestérone significativement plus élevées dans les échantillons de sérum par rapport au plasma (EDTA ou hépariné) pour un dosage ELISA quantitatif (Thuróczy *et al.*, 2003). Plus récemment, Fontbonne et son équipe ont mis en évidence une différence significative entre les valeurs de progestérone dosées par CLIA et SPFS sur sérum et plasma hépariné. Les valeurs de progestérone dans le plasma hépariné étaient plus faibles (Fontbonne *et al.*, 2021).

Cependant, une autre étude réalisée par Tahir et ses collaborateurs n'a pas mis en évidence de différence significative entre le plasma (hépariné ou EDTA) et le sérum pour un dosage CLIA (Tahir *et al.*, 2013). Par mesure de précaution, il est donc recommandé de doser en clinique la progestérone toujours avec le même type d'échantillon et de tube collecteur (Hegstad-Davies, 2006 ; Fontbonne *et al.*, 2021).

3.2.6.3 Limite d'interprétation selon l'état et la conservation de l'échantillon

Les différents travaux de recherche montrent une bonne stabilité de la progestérone dans le plasma. En effet, le plasma non séparé à température entre 4° et 22°C ne montre pas de variation significative de la valeur de la progestérone même au bout de 14 jours (Volkman, 2006 ; Tahir *et al.*, 2013). Il est cependant recommandé de ne pas réfrigérer les échantillons de sang total avant deux heures après le prélèvement car la concentration de progestérone décline significativement (Volkman, 2006).

Il semble qu'il n'y ait de la même manière aucune variation significative des cycles de congélation/décongélation sur les valeurs de progestérone (Tahir *et al.*, 2013).

Certains auteurs rapportent une absence d'effet de l'hémolyse sur les valeurs de progestérone obtenues (Reimers *et al.*, 1991) mais nous avons vu précédemment que la présence de bilirubine dans les échantillons peut nuire à la précision des dosages enzymatiques.

3.2.6.4 Limite d'interprétation des valeurs selon l'heure de la prise de sang

Il est important de considérer l'heure de la prise de sang pour le dosage de la progestéronémie. En effet, des variations journalières de la valeur de cette dernière ont été mises en évidence chez la chienne (Linde-Forsberg *et al.*, 2008).

Ils ont pu montrer chez trois chiennes que la concentration plasmatique de progestérone au jour optimal d'insémination pouvait différer de 7,9 nmol/L jusqu'à 12,7 nmol/L en fonction de l'heure de la journée (Linde-Forsberg *et al.*, 2008).

Thuróczy et ses collaborateurs ont de plus montré qu'en période de proœstrus et d'œstrus la concentration sérique de progestérone est statistiquement plus élevée entre 18h00 et 19h00 qu'entre 08h00 et 09h00. Cependant, ce profil s'inverserait au moment de l'ovulation avec une progestéronémie plus élevée le matin qu'en fin d'après-midi (Thuróczy *et al.*, 2003).

Il est donc conseillé de faire preuve de prudence dans l'interprétation de résultats issus de prélèvements obtenus à des horaires différents.

3.3 Comparaisons des critères généraux des différents automates pour doser la progestérone *in situ*

Cette partie consiste à décrire les caractéristiques techniques des automates et à apporter une contribution personnelle sur leur utilisation en clinique.

3.3.1 Description des caractéristiques spécifiques du Mini-Vidas

Le système ELFA Mini-Vidas® est un automate dont l'utilisation est privilégiée dans les cliniques réalisant de nombreux dosages de progestérone (Fontbonne, 2020). En effet, il semble sa fiabilité l'a vite rendu incontournable auprès des spécialistes de reproduction canine depuis quelques années.

3.3.1.1 Caractéristiques techniques du Mini-Vidas

Le Mini-Vidas® dose la progestérone sur sérum et plasma (quel que soit l'agent anti-coagulant). Le volume de prélèvement nécessaire est de 0,2 ml. L'intervalle de détection de la progestérone est de 0,25 à 80 ng/ml (Biomérieux, 2018).

Le délai d'obtention de résultat pour la progestérone est de 45 minutes. En dehors de la progestérone, le Mini-Vidas dose la thyroxine totale (T4 totale), l'œstradiol, la testostérone, le cortisol sanguin, la troponine ainsi que la présence de toxoplasmes sanguins (Biomérieux, 2018).

Le Mini-Vidas® lorsqu'il est allumé met 45 minutes à se calibrer automatiquement à la température ambiante. Une calibration doit être effectuée manuellement tous les 14 à 28 jours où lorsqu'un nouveau lot est utilisé. Cette

calibration est facilement réalisable. Une maintenance manuelle doit être effectuée tous les mois. Elle consiste en un nettoyage et un contrôle de qualité. Ce contrôle permet de vérifier que le mini-Vidas n'a pas de difficultés à lire des hauts niveaux de fluorescence (Biomérieux, 2018).

Le coût moyen d'un Mini-Vidas® est de 12 000 euros neuf, et de 6000 euros reconditionné, d'après les données disponibles en ligne à ce jour. Ce prix peut cependant varier en fonction de l'état de l'appareil et du marché. Les tests sont vendus par lot de 60. Le prix des kits est d'environ 600 euros, soit 10 euros par test, d'après les catalogues américains en ligne. Ces prix peuvent varier et ne prennent pas en compte la maintenance toutes les deux semaines.

3.3.1.2 Utilisation du Mini-Vidas

Comme vu précédemment, le Mini-Vidas® a une excellente fiabilité de mesures. Cependant, son entretien et son coût sont relativement conséquents par rapport aux autres appareils. Il effectue également d'autres dosages d'endocrinologie, mais sur les sept hormones dosées, trois sont exclusivement des hormones de reproduction. Ces caractéristiques en ont fait l'appareil privilégié des cliniques vétérinaires ayant une spécialité en reproduction canine. Son coût devant être amorti, il n'est intéressant que si un nombre suffisant d'analyses est réalisé.

3.3.2 Description des caractéristiques spécifiques de l'AIA 360®

Le système FEIA AIA 360® est un automate à utilisation pluri-disciplinaire. Sa reproductibilité est excellente pour des valeurs de progestérone supérieures à 2,8 ng/ml et satisfaisante au-dessous.

3.3.2.1 Caractéristiques techniques de l'AIA 360®

L'AIA 360® dose la progestérone sur sérum et plasma uniquement hépariné. Le volume de prélèvement nécessaire est de 0,075 ml. L'intervalle de détection de la progestérone est de 0,25 à 45 ng/ml (Tosoh Bioscience Inc., 2018).

Le délai d'obtention de résultat pour la progestérone est de 18 minutes. En dehors de la progestérone, cet analyseur dose la thyroxine totale et libre (T4 totale et libre), la triiodothyronine totale et libre (T3 totale et libre), le cortisol sanguin, l'adrénocorticotrophine (ACTH), la troponine, l'insuline et les D-Dimères (Tosoh Bioscience Inc., 2018).

L'AIA 360® présente un inconvénient majeur qui est la maintenance de l'appareil. En effet, il nécessite une maintenance hebdomadaire correspondante au nettoyage de la ligne de substrat ; une maintenance mensuelle plus longue permettant le nettoyage des réservoirs de lavage et de dilution. Enfin, tous les six mois, il est nécessaire de décontaminer la ligne de dilution et de lavage (Tosoh Bioscience Inc., 2018).

Le coût moyen d'un AIA 360® est de 18 000 euros neuf, et de 5000 à 7000 euros reconditionné, d'après certains sites de vente de matériel médical. Ces prix ne sont pas contractuels et dépendent de l'état de l'appareil et du marché. Les catalogues américains proposent des kits pour 100 dosages avec un coût de revient pour une analyse de 7 euros environ.

3.3.2.2 Utilisation de l'AIA 360®

Comme vu précédemment, l'AIA 360® est très performant. Cependant, sa maintenance est assez chronophage. Son prix est élevé mais il permet également d'autres dosages d'endocrinologie (10 hormones au total). Ces caractéristiques en font un appareil privilégié des cliniques vétérinaires ayant une forte activité de médecine interne, ne souhaitant pas référer de nombreux dosages. Son entretien doit être régulier avec des auxiliaires dédiées à sa maintenance et son interface.

3.3.3 Description des caractéristiques spécifiques du VCheck® ou Kimmuno1®

3.3.3.1 Caractéristiques du VCheck®

Le Vcheck® dose la progestérone sur sérum uniquement. Le volume de sérum nécessaire est de 0,05 ml. L'intervalle de détection de la progestérone est de 1 à 30 ng/ml (Bionote Inc., 2019).

Le délai d'obtention de résultat pour la progestérone est de 20 minutes. En dehors de la progestérone, cet analyseur dose la troponine, la lipase pancréatique féline et canine (fPL et cPL), le fragment terminal pro-BNP (peptide natriurétique cérébral) ou NT-proBNP canin et félin, le sérum amyloïde A (SAA), la protéine C-réactive (CRP), les D-dimères, la diméthylarginine symétrique (SDMA), le cortisol, la thyroxine (T4) et la thyrostimuline (TSH) (Bionote Inc., 2019).

La maintenance de l'appareil est aisée : l'appareil détecte les problèmes et indique qu'un nettoyage est nécessaire. Les calibrations se font manuellement lorsque les vétérinaires ne sont pas d'accord avec les valeurs obtenues ou lorsque que l'appareil est tombé (Bionote Inc., 2019).

Le prix d'un appareil est d'environ oscille entre 2000 et 5000 euros, d'après les données actuelles et les promotions disponibles en ligne à ce jour. Ce prix dépend du site d'achat et de l'état de l'appareil. Les kits sont vendus pour 10 dosages avec un prix de 15 euros environ par dosage d'après les catalogues américains.

3.3.3.2 Utilisation du VCheck®

Le V-Check® ou Kimmuno1® est un analyseur dont les performances pour doser la progestérone n'ont pas été encore évaluées publiquement. Son entretien est facile, son ergonomie est très pratique et il permet de doser de nombreux paramètres utiles en prise en charge d'urgence comme les lipases pancréatiques, le NT-proBNP ou encore les protéines de l'inflammation. Son utilisation semble plus pertinente dans les structures filtrant beaucoup d'urgences, et dont un dosage extrêmement précis de la progestérone n'est pas primordial pour la prise en charge.

3.3.4 Description des caractéristiques spécifiques du DRI-CHEM AU10V®

3.3.4.1 Caractéristiques du DRI-CHEM AU10V®

Le DRI-CHEM AU10V® dose la progestérone sur plasma et sérum. Le volume de sérum nécessaire est de 0,1 ml. L'intervalle de détection de la progestérone est de 0,20 ng/ml à 40 ng/ml (Fujifilm, 2018).

Le délai d'obtention de résultat pour la progestérone est de 10 minutes. En dehors de la progestérone, cet analyseur dose la T4, la TSH, le cortisol, les acides biliaires et la SAA. Une calibration se fait automatiquement à chaque nouveau lot sorti au scan du QR Code spécifique. La maintenance est peu chronophage et c'est un appareil très compact (Fujifilm, 2018).

Le prix d'un appareil est d'environ 7000 euros, d'après les informations trouvées en ligne sur des sites de vente de matériel médical. Ce prix peut varier en fonction du marché. Le prix des kits est négociable avec le fournisseur Fuji mais non disponible en ligne.

3.3.4.2 Utilisation de l'AU10V

L'étude de performance récemment réalisée de ce nouvel analyseur Fuji le présente comme une bonne alternative pour une mesure rapide de la progestérone au chevet du patient. Cependant la gamme de dosage développée en parallèle est moins large que pour les précédents appareils. Sa petite taille et son entretien en font un allié idéal pour des cliniques vétérinaires voulant étoffer leur gamme de dosage clinique.

Les cliniques qui souhaitent s'équiper pour mesurer la TSH, le cortisol et la SAA généralement non fournies parmi les analyseurs de biochimie présents sur le marché peuvent trouver une grande utilité clinique auprès de cet analyseur.

3.3.5 Description des caractéristiques spécifiques du Speed Reader®

3.3.5.1 Caractéristiques du Speed Reader®

Le Speed Reader® dose la progestérone sur sérum et plasma hépariné Le volume de sérum nécessaire est de 0,1 ml. L'intervalle de détection de la progestérone est de 1 ng/ml à 20 ng/ml.

Le délai d'obtention de résultat pour la progestérone est de 15 minutes. En dehors de la progestérone, cet analyseur dose la T4, le cortisol et la Canine Prostate Specific-Esterase ou CPSE (hormone émise lors d'hyperplasie de la prostate chez le chien). La maintenance est peu chronophage et l'appareil se calibre à la lecture d'une puce à chaque nouveau lot. Cet appareil nécessite plusieurs pipetages et un opérateur minutieux (Fontbonne, 2020). Le Speed Reader est de plus un des plus petit analyseurs quantitatifs dosant la progestérone et son coût (non communiqué en ligne et dépend des offres de Virbac BVT) est plus attractif que les autres (BVT Virbac, 2017). Une boîte de six tests a un coût hors taxe de 68,23 euros, soit 11,30 euros par test d'après le catalogue (COVETO, 2021).

3.3.5.2 Utilisation du Speed Reader®

Son coût, son entretien peu chronophage et sa taille peuvent le rendre attractif car il y a une bonne corrélation avec un dosage de référence pour les valeurs d'ovulation (Maenhoudt *et al.*, 2017). Cependant, il nécessite la présence d'un opérateur minutieux. Il n'y a pas eu d'étude approfondies concernant les valeurs basses et hautes de progestérone au cours du cycle. Son utilisation est donc à privilégier pour des suivis d'ovulation uniquement, avec un utilisateur disponible pendant le temps nécessaire pour réaliser les différents pipetages.

3.3.6 Description des caractéristiques spécifiques du Catalyst Progesterone®

3.3.6.1 Caractéristiques du Catalyst®

Les analyseurs Catalyst® d'Idexx comme le Catalyst One® ou le Catalyst Dx® dosent la progestérone sur sérum, plasma hépariné et sang total hépariné. Le volume d'échantillon nécessaire est de 0,6 à 0,8 ml pour du sang total, et de 0,12 à 0,3 ml pour du sérum ou du plasma. La gamme dynamique mesurée de la progestérone est de 0,2 ng/ml à 20 ng/ml. Le délai d'obtention de résultat pour la progestérone est de 12 minutes, si la progestérone est le seul paramètre dosé (Idexx Laboratories Inc., 2018).

L'entretien du Catalyst® est mensuel avec un nettoyage manuel au gant latex des composants internes associé à un contrôle qualité. Ce contrôle est réalisé à l'aide d'un kit appelé CLIP CQ contenant toutes les plaquettes nécessaires à la calibration de l'appareil. En dehors de la progestérone, cet analyseur de biochimie dose une multitude de paramètres. La SDMA est également nouvellement dosée par plaquette individuelle (Idexx Laboratories Inc., 2018).

Le prix oscille entre 5000 et 7000 euros pour un Catalyst Dx d'occasion et d'environ 15000 dollars pour un Catalyst One, d'après les informations trouvées en ligne pour du matériel d'occasion. Les cartouches de progestérone sont vendues par boîte de 6 au prix hors taxe de 133,56 euros, soit environ 22,25 euros par dosage (COVETO, 2021).

3.3.6.2 Utilisation du Catalyst Progesterone®

L'étude de performance réalisée récemment présente le dosage ELISA Catalyst Progesterone® comme une solution très bien corrélée au dosage LC-MS pour une mesure rapide de la progestérone. Cependant cette étude a été réalisée par le laboratoire et nous avons vu que les dosages colorimétriques ELISA présentent plus fréquemment des biais que les autres systèmes. La gamme de dosage est satisfaisante, bien que le dosage soit impossible au-delà de 20 ng/ml. Son utilisation est donc pratique chez des cliniques souhaitant s'équiper avec un analyseur de biochimie Idexx®, ou bien possédant déjà cet analyseur. Le coût d'un analyseur Catalyst® est trop élevé pour une utilisation unique du dosage de la progestérone. Leur banque de paramètres est large, mais certaines hormones ne sont pas dosables comme le cortisol ou la TSH.

3.3.7 Description des caractéristiques de l'Ovucheck Plasma

3.3.7.1 Caractéristiques de l'Ovucheck Plasma®

Le dosage quantitatif ELISA Ovucheck Plasma® est réalisé sur un spectrophotomètre de poche qui présente cinq cupules, quatre pour les solutions étalons et une pour le prélèvement. Les résultats sont obtenus en 85 minutes. Ce test est validé pour la chienne et la vache. Le lecteur est utilisable également pour un test Ovucheck Milk® qui dose la progestérone de la même manière dans le lait de vache pour le diagnostic de gestation (Kitvia, 2013).

Le lecteur a un prix inférieur à 1000 euros et chaque test coûte une dizaine d'euros. Chaque lot permet de doser 92 échantillons en moyenne. La manipulation est assez chronophage avec beaucoup de temps d'incubation et des pipetages réguliers. Le lecteur ne demande aucun entretien particulier (Kitvia, 2013).

3.3.7.2 Utilisation de l'Ovucheck Plasma®

L'Ovucheck Plasma® possède les qualités idéales d'un test quantitatif utilisable à la fois chez les bovins et les chiens en alliant un coût très faible de matériel. Son utilisation est particulièrement intéressante en clientèle mixte bovine et canine avec des éleveurs canins qui reproduisent en monte naturelle ou semence fraîche et réfrigérée. La précision du test est très convenable pour son utilisation dans le diagnostic de gestation ou d'ovulation. Chaque dosage est cependant assez chronophage et il est plus que recommandé d'utiliser un frottis vaginal en complément pour le diagnostic d'ovulation et suivi de chaleurs pour la chienne.

3.3.8 Description des caractéristiques des tests semi-quantitatifs

3.3.8.1 Caractéristiques de l'Ovucheck Premate® et de l'Ovulation Test®

Ces deux tests sont commercialisés par des laboratoires concurrents depuis de nombreuses années. La manipulation nécessaire pour ces deux types de tests dure environ 2 minutes et les résultats de lecture sont lisibles au bout de 10 minutes pour l'Ovulation Test® et de 35 minutes pour l'Ovucheck Premate®. Les échantillons peuvent être du sérum ou du plasma et leur volume est très faible (quelques gouttes).

Ces deux tests n'utilisent aucun matériel coûteux et les kits sont conservables plusieurs mois réfrigérés (14 mois). Pour rappel l'Ovucheck Premate® compare visuellement l'échantillon avec deux solutions étalons, tandis que l'Ovulation Test® utilise un diagnostic visuel par rapport à un nuancier coloré.

Le coût de chaque test est de 17,50 euros hors taxe pour l'Ovulation Test®, et entre 19,80 euros et 25 euros pour le Premate® (COVETO, 2021).

3.3.8.2 Utilisation des tests semi-quantitatifs

L'utilisation de ces tests n'est pas recommandée pour un suivi de chaleurs précis chez la chienne (Fontbonne, 2020). Ils peuvent avoir une utilité pour exclure une date imminente de parturition mais ils ne sont pas utilisables pour des recherches pathologiques ou une étude précise d'un suivi de chaleurs. Il n'est pas recommandé

d'utiliser cette méthode pour une insémination avec semence congelée. Les cliniques ne souhaitant pas s'équiper d'un matériel coûteux pour des dosages très ponctuels de progestérone dans un contexte de mise-bas imminente pourront se fournir en tests semi-quantitatifs (Ververidis *et al.*, 2002).

Conclusion

La mesure de la progestéronémie couplée au frottis vaginal est actuellement considéré comme la méthode de référence du suivi de chaleurs et permet de détecter des anomalies de cycle ovarien. Le dosage de la progestérone permet de plus de détecter des anomalies du fonctionnement lutéal et de calculer avec une précision satisfaisante les durées de gestation à partir de l'ovulation. La progestérone est donc devenue un marqueur nécessaire à la gestion de la reproduction.

Il existe de nos jours de nombreuses techniques de dosages différentes. Les techniques immunologiques quantitatives sont les plus développées. Elles impliquent des complexes anticorps-progestérone et des dosages par révélation enzymatique ou par laser. Les techniques de référence actuelles sont la RIA et la LC-MS mais elles ne sont accessibles qu'en laboratoire de recherche. Les laboratoires vétérinaires où sont désormais envoyés les prélèvements utilisent le plus souvent la technique CLIA, une technique coûteuse mais très fiable et dont les performances sont excellentes pour des valeurs faibles et élevées. Cependant si le prélèvement doit être expédié auprès d'un laboratoire spécialisé, les résultats ont un délai d'un jour en moyenne et leur coût est élevé pour les propriétaires.

De nombreux fabricants ont donc développé des techniques rapides et performantes au chevet du patient. Les performances et caractéristiques des analyseurs disponibles sur le marché français pour le dosage de la progestérone sont variables. Ainsi, chaque structure peut adapter son choix de dosage par rapport au besoin et ses prévisions de développement de nouveaux services.

Ainsi les analyseurs FEIA et ELFA sont majoritairement utilisés dans des structures spécialisées ayant un volume de dosages hormonaux conséquents (Centre Hospitaliers Vétérinaires, cliniques spécialisées en reproduction, clinique de référent en médecine interne). Les structures à vocation plus urgentiste ou moins spécialisées préféreront des analyseurs moins coûteux utilisant des techniques fiables mais avec une gamme de dosage et des paramètres hormonaux différents. Enfin les dosages ELISA quantitatifs ou semi-quantitatifs, moins coûteux et moins précis, sont à privilégier pour des structures plus généralistes ayant une clientèle d'éleveurs peu développée.

Liste des références bibliographiques

- ARBEITER K. (1993) Anovulatory ovarian cycles in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, 453-456
- AUBERT B., BIAU A., DELIGNE J.M., *et al.* (2009) Radioprotection : Radionucléides, Tritium. *In* *inrf.fr*.
[[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwid7lv11tHyAhURHxoKHS9jCysQFnoECCMQAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.inrs.fr%2Fdms%2FInrs%2FCataloguePapier%2FED%2FTI-ED-4303%2fed4303.pdf&usg=AOvVaw3xu2CAIszxFmxuJrBs7k6](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwid7lv11tHyAhURHxoKHS9jCysQFnoECCMQAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.inrs.fr%2Fdms%2FInrs%2FCataloguePapier%2FED%2FTI-ED-4303%2Fed4303.pdf&usg=AOvVaw3xu2CAIszxFmxuJrBs7k6)] (consulté le 01/06/2021).
- AUFRÈRE M.B., BENSON H. (1976) Progesterone: An overview and recent advances. *J. Pharm. Sci.* 65(6), 783-800
- BARON F. (2006) Étude de la période pré-ovulatoire chez la chienne Berger Allemand. Thèse Méd. Vét. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
- BECCAGLIA M., ALONGE S., TROVO' C., LUVONI G.C. (2016) Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update. *Reprod. Dom. Anim.* 51, 12-17
- BECHER A., WEHREND A., GOERICKE-PESCH S. (2010) Luteale Insuffizienz bei der Hündin – Symptome, Diagnose, Folgen und Therapie: Eine Übersicht der Literatur. *Tierarztl. Prax. Ausg. K.* 38(06), 389-396
- BECKMAN COULTER INC. (2020) Access Progesterone: Mode d'emploi. *In* *beckmancoulter.com*. [https://www.beckmancoulter.com/download/file/phxA34447P-FR_FR/A34447P?type=pdf] (consulté le 01/04/2021).
- BÉNÉ M.C., DROUET C., FISSON S., SEILLÈS E. (2014) Techniques avec traceur. *In Méthodes en immunologie. Des principes aux bonnes applications*. Issy-les-Moulineaux, Elsevier Masson, pp 41-74
- BERGERON L.H., NYKAMP S.G., BRISSON B.A., MADAN P., GARTLEY C.J. (2013) An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology* 79(2), 274-283
- BERSON S.A., YALOW R.S. (1959) Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. Clin. Invest.* 38(11), 1996-2016
- BILBROUGH G., GLAVAN T. (2019) Catalyst Progesterone for in-house measurement of progesterone in plasma for bitches. *In Idexx.Com*. [<https://www.idexx.com/files/catalyst-progesterone-white-paper-en.pdf>] (consulté le 01/02/2021).
- BIOMÉRIEUX (2018) Plaquette VIDAS®. *In biomerieux-industry.com*. [<https://www.biomerieux-industry.com/sites/default/files/2020-04/2018%2010%20Nouvelle%20plaquettes%20VIDAS.pdf>] (consulté le 11/03/2021).
- BIONOTE INC. (2019) Leaflet: Vcheck cProgesterone. *In bionote.co*. [http://bionote.co.kr/eng/board/vcheck_reagent/board_view.asp?num=574] (consulté le 10/02/2021).
- BIOVET INC. (2013) Notice d'utilisation du Kit OVUCHECK Premate. *In kitvia.com*. [<https://www.kitvia.com/ovucheck-premate>] (consulté le 02/04/2020).
- BLANCHARD S. (2006) L'insuffisance lutéale chez les femelles domestiques et la femme. Thèse Méd. Vét. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
- BOUCHARD G.F., SOLORZANO N., CONCANNON P.W., YOUNGQUIST R.S., BIRSCHWAL C.J. (1991) Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology* 35(3), 603-611

BRUGGER N., OTZDORFF C., WALTER B., HOFFMANN B., BRAUN J. (2011) Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescence Assay: P4 in Canine Blood Serum Using an ELFA. *Reprod. Dom. Anim.* 46(5), 870-873

BUFF S. (2001) Les avortements spontanés chez la chienne. *Prat. méd. chir. anim. cie.* 36(suppl.3), 16-18

BULUN S.E. (2016) Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis. In *Williams Textbook of Endocrinology*, Eds Williams R., 13^e ed. Philadelphia, PA, Elsevier, pp 590-663

BVT VIRBAC (2001) Ovulation Test™. In *bvt.virbac.com*. [https://bvt.virbac.com/files/live/sites/bvt-public/files/contributed/Notices%20produits/XPROTOM8OVT_V1%20_web.pdf] (consulté le 22/01/2021).

BVT VIRBAC (2017) Brochure Speed TM Gamme Biomarqueurs : La performance accessible au quotidien. In *vet-uk.virbac.com*. [<https://docplayer.fr/55780469-La-performance-accessible-au-quotidien.html>] (consulté le 22/01/2021).

CHAPWANYA A., CLEGG T., STANLEY P., VAUGHAN L. (2008) Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology* 70(5), 795-799

CHASTANT-MAILLARD S., VIARIS DE LESEGNO C., CHEBROUT M., *et al.* (2011) The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 23(3), 391-402

CINQUANTA L., FONTANA D.E., BIZZARO N. (2017) Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmun. Highlights* 8(1), 1-9

CONCANNON P. (1977) Changes in LH, Progesterone and Sexual Behavior Associated with Preovulatory Luteinization in the Bitch. *Biol. Reprod.* 17(4), 604-613

CONCANNON P.W., WHALEY S., LEIN D., WISSLER R. (1983) Canine gestation length: Variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am. J. Vet. Res* 44(10), 1819-1821

CONCANNON P.W. (1986) Canine Pregnancy and Parturition. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 16(3), 453-475

CONCANNON P. (2000) Canine Pregnancy : Predicting Parturition and Timing Events of Gestation. In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Eds Concannon P.W., England E., Verstegen J. International Veterinary Information Service

CONCANNON P.W. (2005) Understanding and monitoring canine pregnancy. In *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*, Mexico, May 11-14

CONCANNON P.W., CASTRACANE V.D., TEMPLE M., MONTANEZ A. (2009) Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Anim. Reprod.* 6(1), 172-193

CONCANNON P. (2009) Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reprod. Domes. Anim.* 44, 3-15

CONCANNON P.W. (2010) Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 124(3-4), 200-210

CONSTANT F., MAUFFRÉ V., TIRET L. (2019) Connaissance et Maîtrise de la reproduction. Polycopié. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de Reproduction Animale et de Physiologie

CORDONNIER N. (2020) Histologie de l'ovaire et des voies génitales femelles. Présentation. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique d'Histologie et

d'Anatomie Pathologique

COVETO (2021) Catalogue COVETO 2021. *In coveto.fr*. [<https://www.coveto.fr/index-ecatalogue.html>] (consulté le 01/06/2021).

DAVIES C. (2013) Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA). *In The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*, 4^e ed. Amsterdam, Elsevier, pp 29-59

DE CRAMER K.G.M., NÖTHLING J.O. (2018) The precision of predicting the time of onset of parturition in the bitch using the level of progesterone in plasma during the preparturient period. *Theriogenology* 107, 211-218

DESQUILBET L. (2020) Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure : répétabilité, reproductibilité, et concordance. Polycopié. ENVA, Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques

ENGLAND G.C.W., ALLEN W.E., PORTER D.J. (1989) A comparison of radio-immunoassay with quantitative and qualitative enzyme-linked immunoassay for plasma progestogen detection in bitches. *Vet. Rec.* 125, 107-108

ENGLAND G.C.W. (1991) ELISA determination of whole blood and plasma progestogen concentrations in bitches. *Vet. Rec.* 129(10), 221-222

ENGLAND G.C.W. (2010) Clinical approach to the infertile bitch. *In BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*, Eds England G.C.W., Von Heimendal A., 2^e ed. Gloucester, England, British Small Animal Veterinary Association, pp 51-62

ENGLAND G.C.W., VERSTEGEN J.P. (1996) Prediction of parturition in the bitch using semi-quantitative ELISA measurement of plasma progesterone concentration. *Vet. Rec.* 139(20), 496-497

ENGVALL E., PERLMANN P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9), 871-874

FELDMAN E.C., NELSON R.W. (2004a) Ovarian cycle and vaginal cytology. *In Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3^e ed. St. Louis, Mo, Saunders, pp 752-773

FELDMAN E.C., NELSON R.W. (2004b) Infertility, associated breeding disorders and disorders, of sexual development. *In Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3^e ed. St. Louis, Mo, Saunders, pp 868-899

FONTBONNE A. (1992) Utilisation du dosage de la progestérone chez la chienne. *In Reproduction du chien et du chat, Les indispensables*, Eds Dumon C., Fontbonne A. Paris, PMCAC, pp 53-58

FONTBONNE A., REYNAUD K., MARSELOO N., *et al.* (2005) In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130(2), 193-201

FONTBONNE A. (2008) In vivo ovulation, oocyte maturation and fertilisation in the bitch. Thèse de doctorat. Agro Paris Tech

FONTBONNE A. (2011) Infertility in bitches and queens : recent advances. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35(2), 202-209

FONTBONNE A. (2020) Discussion sur l'utilité des dosages hormonaux en laboratoire de référence et en clinique vétérinaire. Communication orale, École nationale vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport, Maisons-Alfort, 20 Juin

FONTBONNE A., MAENHOUDT C., THOUMIRE S., *et al.* (2021) Evaluation of surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy for rapid measurement of progesterone concentration in bitches. *Am. J. Vet. Res.* 82(5), 417-424

FRASER N., WILBORN R., SCHULTZ W. (2015) Comparative progesterone assay. *In*

The Society for Theriogenology Congress, San Antonio, August 9

FUJIFILM (2018) Fiche technique FUJI DRI-CHEM IMMUNO AU CARTRIDGE v-PRG. In *Fujifilm.Com*. [https://www.fujifilm.com/products/medical/fdc/pdf/index/9905110-A4_ifU_PRG.pdf] (consulté le 12/05/2021).

FULLER J.L. (1956) Photoperiodic control of estrus in the Basenji. *J Hered* 47, 179-180

GAYRARD V. (2018) Physiologie de la reproduction des mammifères domestiques. Polycopié. ENVT, Unité pédagogique de physiologie de la reproduction, endocrinologie

GLORIA A., CONTRI A., CARLUCCIO A., ROBBE D. (2018) Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog. *Anim. Reprod. Sci.* 192, 179-184

GÖRLINGER S., GALAC S., KOOISTRA H.S., OKKENS A.C. (2005) Hypoluteoidism in a bitch. *Theriogenology* 64(1), 213-219

GRANGE R.D., THOMPSON J.P., LAMBERT D.G. (2014) Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br. J. Anaesth.* 112(2), 213-216

GÜNZEL-APEL A.-R., ZABEL S., BUNCK C.F., *et al.* (2006) Concentrations of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs. *Theriogenology* 66(6-7), 1431-1435

HANNON W.H., ATKINSON M.A., BALL D.J., *et al.* (2004) Assessing the Quality of Immunoassay Systems: Radioimmunoassays and Enzyme, Fluorescence, and Luminescence Immunoassays; Approved Guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 24(16), 1-35

HANZEN C., LOURTIE O., DRION P.V., DEPIERREUX C., CHRISTIANS E. (1999) La mortalité embryonnaire, 2. Implications hormonales. *Ann. Méd. Vét* 143, 179-189

HEGSTAD-DAVIES R.L. (2006) A review of sample handling considerations for reproductive and thyroid hormone measurement in serum or plasma. *Theriogenology* 66(3), 592-598

HENRICKS D.M. (1991) Biochemistry and Physiology of the Gonadal Hormones. In *Reproduction in Domestic Animals*, 4^e ed. San Diego, Academic Press, pp 81-118

HOLLINSHEAD F., HANLON D. (2019) Normal progesterone profiles during estrus in the bitch : A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology* 125, 37-42

IDEXX LABORATORIES INC. (2018) Catalyst Dx® l'analyseur biochimie : Manuel d'utilisation. In *ca.idexx.com*. [<https://ca.idexx.com/files/catalyst-dx-operator-guide-fr.pdf>] (consulté le 28/05/2021).

IDEXX LABORATORIES INC. (2019) Catalyst Progesterone : Frequently Asked Questions. In *Idexx.Com*. [<https://www.idexx.com/files/catalyst-progesterone-faqs.pdf>] (consulté le 28/05/2021).

JEFFCOATE I. (1998) Physiology and Endocrinology of Reproduction in Female Dogs. In *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. Gloucester, England, British Small Animal Veterinary Association

JOHNSON C.A. (2008) High-risk pregnancy and hypoluteoidism in the bitch. *Theriogenology* 70(9), 1424-1430

JOHNSTON, ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON N.S. (2001) The Canine Estrous Cycle. In *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia, Saunders, pp 16,31

JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON N.S. (2001) Breeding Management and Artificial Insemination of the Bitch. In *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia, Saunders, pp 41,65

KITVIA (2013) Ovucheck Plasma : Brochure. In *Kitvia.Com*. [<https://www.kitvia.com/ovucheck-plasma>] (consulté le 15/05/2021).

KLEIN M., MAYER G. (1963) Reproduction. In *Physiologie. Les grandes fonctions*.

Paris, Éditions Médicales Flammarion, pp 721-830

KOWALEWSKI M.P. (2018) Selected Comparative Aspects of Canine Female Reproductive Physiology. *In Encyclopedia of Reproduction*, 2^e ed. San Diego, Academic Press, Elsevier, pp 682-691

KRACHUDEL J., BONDZIO A., EINSPANIER R., *et al.* (2013) Luteal insufficiency in bitches as a consequence of an autoimmune response against progesterone? *Theriogenology* 79(9), 1278-1283

KUTZLER M.A., MOHAMMED H.O., LAMB S.V., MEYERS-WALLEN V.N. (2003) Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology* 60(6), 1187-1196

LEE S., ZHAO M., NO J., *et al.* (2017) Dog cloning with in vivo matured oocytes obtained using electric chemiluminescence immunoassay-predicted ovulation method. *PLoS One* 12(3), e0173735

LEROYER C., TAINTURIER D., DARDENNE N. (2002) Prévion de la mise bas chez la chienne par dosage de la progestérone. *Rev. Méd. Vét* 153(7), 467-476

LEVY X., FONTAINE E., SEGALINI V., FONTBONNE A. (2009) Elective Caesarean Operation in the Bitch Using Aglepristone Before the Pre-Partum Decline in Peripheral Progesterone Concentration. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 182-184

LÉVY X. (2011) « Chaleurs silencieuses » chez une chienne. *Point Vét.* n°321, 34-37

LI J.-F., LI C.-Y., AROCA R.F. (2017) Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* 46(13), 3962-3979

LIEBERMANN T., KNOLL W. (2000) Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Colloids. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 171(1-3), 115-130

LIN H.-Y., MULLER Y.A., HAMMOND G.L. (2010) Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316(1), 3-12

LINDE-FORSBERG C., STRÖM HOLST B., FORSBERG M. (2008) Daily progesterone fluctuations during the oestrus cycle in the bitch. *In Proceedings of the EVSSAR Congress*, Vienna, July 9-11, pp 134-135

LINDE-FORSBERG C., ENEROTH A. (2000) Abnormalities in pregnancy, parturition and the periparturient period. *In Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat.*, Eds Ettinger S.J., Feldman E.C., 5^e ed. Philadelphia, Saunders, pp 1655-1677

LUC A. (2005) Intérêt de l'Interprétation des frottis vaginaux chez la chienne en début de proœstrus lors du suivi de chaleurs : Etude expérimentale. Thèse Méd. Vét. École nationale vétérinaire d'Alfort

MAENHOUDT C., CLARET E., LOUKERI S., SANTOS N. (2017) Progesterone in the reproduction of the bitch: comparative results and interpretation of Speed ProgesteroneTM and electrochemiluminescence immunoassay. *In XXth International Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction*, Vienne, June 29-July 1

MAKLER M.T., BAKKE A.C., PIPER R.C. (1988) An enzyme immunoassay for the flow cytometer (FEIA). *J. Immunol. Methods* 108, 137-143

MARINGUE C. (2015) Insémination artificielle en semence congelée chez la chienne : analyse des dossiers des chiennes suivies au centre d'étude en reproduction des carnivores de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (CERCA) de Janvier 2007 à Décembre 2015. Thèse Méd. Vét. École nationale vétérinaire d'Alfort

MAUVAIS-JARVIS P., SCHAISON G., TOURAIN P. (1997) Médecine de la reproduction, 3^e ed. Paris, Flammarion médecine-science

MEYERS-WALLEN V.N. (2007) Unusual and abnormal canine estrous cycles.

Theriogenology 68(9), 1205-1210

- MIDGLEY A.R., NISWENDER G.D., REBAR R.W. (1969) Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Eur. J. Endocrinol.* 62(Suppl_1), S163-S184
- MIR F., BILLAULT C., FONTAINE E., SENDRA J., FONTBONNE A. (2011) Estimated Pregnancy Length from Ovulation to Parturition in the Bitch and its Influencing Factors: A Retrospective Study in 162 Pregnancies. *Reprod. Domest. Anim.* 46(6), 994-998
- MONINO A., DRI P., BECCAGLIA M., MILITE G. (2012) Accurate determination of serum progesterone using a Fluorescence Enzyme Immunoassay in the bitch. Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Whistler, Canada, July 26-29
- MOXON R., COPLEY D., ENGLAND G.C.W. (2010) Technical and financial evaluation of assays for progesterone in canine practice in the UK. *Vet. Rec.* 167(14), 528-531
- MULAC-JERICEVIC B., CONNEELY O. (2004) Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128(2), 139-146
- NEUBURGER L.-M. (2006) Design of fluorescence immunoassays. Perspectives for continuous monitoring of biological warfare agents. Thèse de doctorat. AgroParisTech
- NIEWIADOMSKA Z., FONTBONNE A. (2020) Les différents appareils de dosage de la progestérone, avantages et inconvénients. *Nouv. Prat. Vet. canine-féline Hors-Série*, 47-54
- NÖTHLING J.O., DE CRAMER K.G.M. (2018) Comparing the values of progesterone in the blood of bitches as measured with a chemiluminescence immunoassay and a radioimmunoassay. *Reprod. Dom. Anim.* 53(5), 1136-1141
- NÖTHLING J.O., DE CRAMER K.G.M. (2019) Comparison of progesterone assay by chemiluminescence or radioimmunoassay for clinical decision-making in canine reproduction. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 90(0), a1730
- NOWAK M., BOOS A., KOWALEWSKI M.P. (2018) Luteal and hypophyseal expression of the canine relaxin (RLN) system during pregnancy: Implications for luteotropic function. *PLoS One* 13(1), e0191374
- OKKENS A.C., TEUNISSEN J.M., VAN OSCH W., *et al.* (2001) Influence of litter size and breed on the duration of gestation in dogs. *J. Reprod. Fertil.* Supplement 57, 193-197
- ORBIO LABORATOIRE (2019) Bon de commande 2019: Gamme animaux de compagnie. *In orbio.fr.* [https://www.orbio.fr/media/bc_animaux_de_compagnie_2019__web__040841600_1_131_07022019.pdf] (consulté le 01/04/2021).
- PARKER N., SCHNEEGURT M., THI TU A.-H., LISTER P., FORSTER B.M. (2016) Enzyme Immunoassays (EIA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). *In Bio.Libretexts.Org.* [<https://bio.libretexts.org/@go/page/5240>] (consulté le 19/01/2021).
- PATRONO C., PESKAR B.A. (1987) Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag
- PITT J.J. (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin. Bioch. Rev.* 30(1), 19-34
- PORSTMANN T., KIESSIG S.T. (1992) Enzyme immunoassay techniques an overview. *J. Immunol. Methods* 150(1-2), 5-21
- RANNOU B., NICOLAS C.S. (2018) Comment bien réaliser et interpréter un dosage hormonal à la clinique. *Point Vét.* n°384, 13-19
- REIMERS T.J., LAMB S.V., BARTLETT S.A., *et al.* (1991) Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses.

Am. J. Vet. Res. 52(7), 1075-1080

REYNAUD K., FONTBONNE A., MARSELOO N., *et al.* (2005) Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire chez la chienne. *Bull. Acad. Vét. Fr.* 158(2), 167-172

REYNAUD K., FONTBONNE A., MARSELOO N., *et al.* (2006) In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis : a review. *Theriogenology* 66(6-7), 1685-1693

ROBIN T. (2018) Recueil et analyse descriptive des abstracts des études non publiées présentées aux congrès de l'EVSSAR, de 1998 à 2015. Thèse Méd. Vét. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

ROCHE DIAGNOSTICS (2016) Methode Sheet: Progesterone II, Cobas®. *In storage.googleapis.com.* [<https://storage.googleapis.com/plos-corpus-prod/10.1371/journal.pone.0206098/1/pone.0206098.s002.pdf>] (consulté le 09/05/2021).

ROMAGNOLI S., LOPATE C. (2017) Reproductive Endocrinology and Breeding Husbandry of the Bitch. *In Textbook of Veterinary Internal Medicine : diseases of the dog and cat.*, Eds Ettinger S., 8^e ed. St Louis, Elsevier, pp 4459-4492

ROOS J., MAENHOUDT C., ZILBERSTEIN L., *et al.* (2018) Neonatal puppy survival after planned caesarean section in the bitch using aglepristone as a primer: A retrospective study on 74 cases. *Reprod. Dom. Anim.* 53(Suppl. 3), 85-95

ROOS J., FONTBONNE A. (2017) Le syndrome de rémanence ovarienne chez la chienne : mécanismes, clinique et diagnostic. *Point Vét.* 376, 28-33

ROOT KUSTRITZ M.V. (2010) Canine reproductive physiology. *In Clinical Canine and Feline Reproduction. Evidence-Based Answers.* Ames, Iowa, Wiley-Blackwell, pp 67,78

ROTA A., VANNOZZI I., MARIANELLI S., GAVAZZA A., LUBAS G. (2016) Laboratory and Clinical Evaluation of a Feia Method for Canine Serum Progesterone Assay. *Reprod. Dom. Anim.* 51(1), 69-74

SAKAMOTO S., PUTALUN W., VIMOLMANGKANG S., *et al.* (2018) Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J. Nat. Med.* 72(1), 32-42

SALAZAR A., VELÁZQUEZ-SOTO H., AYALA-BALBOA J., JIMÉNEZ-MARTÍNEZ M.C. (2017) Allergen-Based Diagnostic: Novel and Old Methodologies with New Approaches. *In Allergen.* London, Intech Open, pp 77-99

SCHÄFER-SOMI S., SONTAS B.H., SCHWENDENWEIN I. (2013) The use of a portable miniphotometer device (Ovucheck Reader®, Biovet, Canada) for semi-quantitative assessment of canine serum progesterone concentrations. The 16th Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Toulouse, France, July 5-6

SCHMICKE M., URHAUSEN C., WOLF K., SCHMIDT S., GÜNZEL-APEL A.-R. (2016) Evaluation der mittels Chemilumineszenztest gemessenen Blut- Progesteronkonzentration bei der Hündin am Tag der Ovulation. *Tierärztl. Prax. Ausg. K.* 44(5), 317-322

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS (2013) Progesterone for use on IMMULITE® 2000 systems. *In siemens-healthineers.com.* [<https://www.siemens-healthineers.com/fr/immunoassay/systems/immulite-2000-xpi-immunoassay-system>] (consulté le 09/05/2021).

SIEMENS HEALTHINEERS (2021) Immulite 1000 Immunoassay System. *In Siemens-Healthineers.Com.* [<https://www.siemens-healthineers.com/en-us/immunoassay/systems/immulite-1000-immunoassay-system>] (consulté le

01/04/2021).

SMITH F.O. (2007) Challenges in small animal parturition—Timing elective and emergency cesarian sections. *Theriogenology* 68(3), 348-353

SONIGO C., YOUNG J., BINART N. (2013) Hyperprolactinémie et infertilité : Approche physiopathologique. *Med. Sci.* 29(3), 242-244

SRIKANDAKUMAR A., INGRAHAM R.H., ELLSWORTH M., *et al.* (1986) Comparison of a solid-phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch, and cow. *Theriogenology* 26(6), 779-793

STECKLER D., NÖTHLING J.O., HARPER C. (2013) Prediction of the optimal time for insemination using frozen-thawed semen in a multi-sire insemination trial in bitches. *Anim. Reprod. Sci.* 142(3-4), 191-197

TAHIR M.Z, THOUMIRE S., RAFFAELLI M., *et al.* (2013) Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch. *Dom. Anim. Endocrinol.* 45(3), 141-4

TAL S., MAZAKI-TOVI M., DRUKER S., *et al.* (2020) Evaluation of two chemiluminescent assays compared with radioimmunoassay for serum progesterone measurement in bitches. *Theriogenology* 15, 116-123

THÉBAULT A. (2006) Diagnostic et traitement de l'infertilité chez la chienne. *Point Vét.* n°266, 42-45

THURÓCZY J., WÖLFLING A., TIBOLD A., *et al.* (2003) Effect of Anticoagulants and Sampling Time on Results of Progesterone Determination in Canine Blood Samples: Effect of Anticoagulants and Sampling Time on Progesterone in Canine Blood. *Reprod. Dom. Anim.* 38(5), 386-389

THURÓCZY J., REICZIGEL J., BALOGH L. (2016) Effect of ELISA kit manufacturing process and incubation time on progesterone concentration measured in dog serum for ovulation diagnosis – Short communication. *Acta Vet. Hung.* 64(3), 365-371

TIBOLD A., THURÓCZY J. (2009) Progesterone, Oestradiol, FSH and LH Concentrations in Serum of Progesterone-Treated Pregnant Bitches with Suspected Luteal Insufficiency. *Reprod. Dom. Anim.* 44(Suppl. 2), 129-132

TIRET L. (2017a) Physiologie de la reproduction. Fonction germinale et endocrinienne de l'ovaire. Communication orale.

TIRET L. (2017b) Physiologie de la Reproduction : Contrôle neuro-endocrinien des fonctions gonadiques. Communication orale.

TOSOH BIOSCIENCE INC. (2018) AIA-360® Training Manual. *In docplayer.net.* [<https://docplayer.net/159976827-Tosoh-bioscience-inc-training-manual-p-n-version-10-0.html>] (consulté le 20/05/2021).

TOSOH BIOSCIENCE INC. (2021) ST AIA-PACK PROG II, Notice d'utilisation. *In diagnostics.eu.tosohbioscience.*

[https://www.diagnostics.eu.tosohbioscience.com/File%20Library/TSEN/GlobalNav/MEDIA/Brochures/AIA-360-brochure_V2_HR.pdf] (consulté le 11/05/2021).

TSUTSUI T., HORI T., KIRIHARA N., KAWAKAMI E., CONCANNON P.W. (2006) Relation between mating or ovulation and the duration of gestation in dogs. *Theriogenology* 66(6-7), 1706-1708

TSUTSUI T., TAKAHASHI F., HORI T., KAWAKAMI E., CONCANNON P. (2009) Prolonged Duration of Fertility of Dog Ova. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 230-233

VAN KLAVEREN N.J., KOOISTRA H.S., DIELEMAN S.J., VAN LITH H.A., SCHAEFERS-OKKENS A.C. (2001) The optimal mating time in the bitch based on the progesterone concentration in peripheral blood. A comparison of reliability between three ELISA test kits and a 125-iodine radioimmunoassay. *Tijdschr. Diergeneeskd.*

126(21), 680-5

VERVERIDIS H.N., BOSCO C.M., STEFANAKIS A., KRAMBOVITIS E. (2002) Use of enzyme-immunoassay for oestradiol-17 β and progesterone quantification in canine serum. *Anim. Reprod. Sci.* 69(1-2), 53-64

VIALARET J. (2019) Développement et validation de méthodes de protéomique innovantes pour des applications de biochimie clinique. Thèse de doctorat. Université de Montpellier

VIARIS DE LESEGNO C. (2007) La maturation de l'ovocyte canin in vivo et in vitro. Thèse de doctorat. Agro Paris Tech

VOLKMANN D.H. (2006) The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations. *Theriogenology* 66(6-7), 1583-1586

VOLLER A., BARTLETT A., BIDWELL D.E. (1978) Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* 31, 507-520

WILBORN R.R., MAXWELL H.S. (2012) Clinical Approaches to Infertility in the Bitch. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 42(3), 457-468

YOLKEN R.H., STOPA P.J. (1979) Enzyme-Linked Fluorescence Assay: Ultrasensitive Solid-Phase Assay for Detection of Human Rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 10(3), 317-321

LE DOSAGE DE LA PROGESTÉRONNE CHEZ LA CHIENNE : INDICATIONS, MÉTHODES ET COMPARAISON DES TECHNIQUES

AUTEUR : Gabrielle FERRON

RÉSUMÉ :

Le suivi de reproduction de la chienne s'impose de plus en plus comme une demande incontournable de la clientèle vétérinaire. Actuellement, le dosage de la progestéronémie couplé au frottis vaginal est considéré comme la technique de référence du suivi de chaleurs et permet de détecter des anomalies de cycle ovarien. La progestéronémie seule permet de détecter des anomalies de gestation et de calculer avec une précision satisfaisante les durées de gestation pour anticiper des mises-bas. Enfin, le dosage de la progestérone est nécessaire pour l'exploration d'une infertilité chez la chienne. Toutes ces applications en font un paramètre indispensable à la gestion médicale de la reproduction.

De nombreuses techniques de dosages sont développées avec en première ligne les dosages immunologiques quantitatifs. Ils impliquent des complexes anticorps-progestérone et une détection par réaction enzymatique colorimétrique, lumineuse ou fluorescente ou par excitation laser. Les techniques Gold-Standard actuelles sont la RIA et la LC-MS mais elles ne sont accessibles qu'en laboratoire de recherche. Les laboratoires vétérinaires où sont désormais envoyés les prélèvements de progestérone utilisent le plus souvent la technique CLIA, une technique coûteuse mais très fiable et dont les performances sont excellentes pour des valeurs faibles et élevées.

Enfin, des analyseurs rapides, utilisables au chevet des patients ont plus récemment vu le jour. Ces analyseurs « point-of-care » présentent des performances variables et des caractéristiques propres permettant un choix varié en fonction de la demande de la clientèle. Ainsi les analyseurs FEIA et ELFA, plus coûteux, sont les méthodes de choix pour leur précision dans des structures avec un service de reproduction ou de médecine interne développé. Les techniques ELISA quantitatives ou semi-quantitatives, bien que moins précises, restent des dosages performants pour des structures plus généralistes. Depuis peu, les innovations technologiques comme la SPFS, permettent des nouvelles techniques dosages en clinique de très bonne précision et abordables.

MOTS CLÉS :

REPRODUCTION / DOSAGE / PROGESTÉRONNE / TECHNIQUE / TEST ELISA / GESTATION / CHALEURS / CHIENNE

JURY :

Président : Pr Sylvain BELLIER
Directeur de thèse : Pr Alain FONTBONNE
Examineur : Dr Pierre DESHUIILLERS

PROGESTERONE DETERMINATION IN THE BITCH: INDICATIONS, METHODS AND COMPARISON OF TECHNIQUES

AUTHOR: Gabrielle FERRON

SUMMARY:

The monitoring of the bitch's reproductive cycle is becoming an important reason of presentation at a veterinary clinic. Currently, the progesteronemia dosage coupled with the vaginal smear is considered the Gold-Standard of heat monitoring and allows the detection of ovarian cycle anomalies. Progesteronemia alone allows the detection of gestation abnormalities and the calculation of gestation periods with a satisfactory accuracy to anticipate parturition. At last, progesterone quantitative determination is necessary for the exploration of infertility in the bitch. All these applications make it an essential parameter of reproductive medical management.

Numerous assay techniques have been developed, with quantitative immunological assays being the first. They involve antibody-progesterone complexes and detection by enzymatic colorimetric, luminescent or fluorescent reaction as well as laser excitation. The current Gold-Standard techniques are RIA and LC-MS but they are only available in research laboratories. Veterinary laboratories where progesterone samples are now sent most often use the CLIA technique, an expensive but very reliable technique with excellent performance for low and high values.

Lastly, rapid analyzers for use in veterinary clinics have more recently emerged. These "point-of-care" analyzers have variable performances and specific characteristics allowing a large choice depending on the size of the breeding clientele. Thus, the more expensive FEIA and ELFA analyzers are the methods of choice for their accuracy in facilities with a developed reproduction or internal medicine department. Quantitative or semi-quantitative ELISA techniques, although less precise, remain efficient assays for more generalist structures. Recently, technological innovations such as SPFS, allow new assay techniques in clinics with very good precision and affordability.

KEY WORDS:

REPRODUCTION / ASSAY / PROGESTERONE / TECHNIQUE / ELISA TEST / GESTATION / HEAT / BITCH

JURY:

Chairperson: Pr Sylvain BELLIER

Thesis Director: Pr Alain FONTBONNE

Reviewer: Dr Pierre DESHUIILLERS