

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE  
VETERINAIRE DES PAYS TROPICAUX

D.E.S.S. DE PRODUCTION ANIMALE  
EN REGIONS CHAUDES

PAR

OLAVO OLIVEIRA

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE



UNIVERSITE DE SAO PAULO

FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE ET ZOOTECNIE  
BRESIL

DIAGNOSTIC DE GESTATION CHEZ LES BOVINS PAR  
DOSAGE D'UNE PROTEINE EMBRYONNAIRE AU 28ÈME  
JOUR, APRES I.A.

PRÉSENTÉ LE 7 DÉCEMBRE 1987

JURY D'EXAMEN :

- MONSIEUR J.GRUVEL - PROFESSEUR - PRÉSIDENT
- MONSIEUR P. HUMBLLOT - MAÎTRE DE RECHERCHES
- MONSIEUR M.THIBIER - DIRECTEUR DE RECHERCHES
- MONSIEUR S. CHAFFAUX - MAÎTRE ASSISTANT

U.N.C.E.I.A. - LABORATOIRE POUR LE CONTRÔLE DES  
REPRODUCTEURS - 13, RUE JOUËT - BP 65  
94703 , MAISONS-ALFORT, FRANCE

DIRECTEUR : DOCTEUR VÉTÉRINAIRE M.THIBIER.

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE  
VETERINAIRE DES PAYS TROPICAUX

D.E.S.S. DE PRODUCTION ANIMALE  
EN REGIONS CHAUDES

PAR

OLAVO OLIVEIRA

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

UNIVERSITE DE SAO PAULO

FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE ET ZOOTECHNIE  
BRESIL



DIAGNOSTIC DE GESTATION CHEZ LES BOVINS PAR  
DOSAGE D'UNE PROTEINE EMBRYONNAIRE AU 28ÈME  
JOUR, APRES I.A.

PRÉSENTÉ LE 7 DÉCEMBRE 1987

JURY D'EXAMEN :

MONSIEUR J.GRUVEL - PROFESSEUR - PRÉSIDENT  
MONSIEUR P. HUMBLLOT - MAÎTRE DE RECHERCHES  
MONSIEUR M.THIBIER - DIRECTEUR DE RECHERCHES  
MONSIEUR S. CHAFFAUX - MAÎTRE ASSISTANT

U.N.C.E.I.A. - LABORATOIRE POUR LE CONTRÔLE DES  
REPRODUCTEURS - 13, RUE JOUËT - BP 65  
94703 , MAISONS-ALFORT, FRANCE

DIRECTEUR : DOCTEUR VÉTÉRINAIRE M.THIBIER.

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur J. GRUVEL de l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux qui a bien voulu m'accepter comme son élève.

J'exprime ma profonde gratitude au Docteur Vétérinaire M. THIBIER, Directeur du Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs, pour sa gentillesse à m'accueillir dans son Laboratoire.

Je suis particulièrement reconnaissant au Docteur Vétérinaire Patrice HUMBLLOT, Responsable du Laboratoire d'hormonologie, mon Maître et Professeur de stage, pour sa constante disponibilité, sa patience et sa capacité de travail, mais avant tout pour son amitié.

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur CHAFFAUX pour avoir participé comme Jury lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

Madame Nadine JEANGUYOT et Madame Françoise LE GAL pour l'initiation et leur aide aux techniques des dosages hormonaux.

Madame NAHON pour sa patience et son travail lors de la dactylographie de ce mémoire.

Je tiens à associer dans mes remerciements tout le personnel du Laboratoire et aussi le personnel d'I.E.M.V.T. qui m'ont apporté un soutien tout au long de ce travail pour leur gentillesse et leur chaleureuse amitié.

## SOMMAIRE

RESUME.....	1
INTRODUCTION .....	3
MATERIAL ET METHODES.....	5
I. Animaux.....	5
II. Interventions et Prélèvements.....	5
III. Dosages Radioimmunologiques.....	8
IV Analyse des données.....	9
RESULTATS .....	11
I. Evolution de la PSPB post-partum.....	11
1. Description de la régression des concentrations de PSPB en fonction du temps.....	11
2. Répartition des vaches PSPB positives à JO en fonction du temps post-partum.....	11
3. Etude de la fertilité de l'échantillon suivant les concentrations de PSPB le jour de l'insémination.....	11
II. Résultats d'exactitude du diagnostic de gestation par dosage de PSPB .....	15
1. A J28 .....	15
2. Comparaison avec les résultats d'exactitude du diagnos- tic de gestation par dosage de progestérone.....	15
3. Comparaison du dosage de PSPB 70 jours après l'IA avec les résultats de palpation rectale.....	18
III. Répartition des animaux suivant les concentrations de progesterone et de PSPB.Etude de la mortalité embryonnaire.	18

DISCUSSION .....	26
I. Evolution des concentrations de PSPB au cours du post-partum ; relation avec la fertilité ultérieure.....	26
II. Exactitude du diagnostic de gestation par dosage de PSPB...	26
1. A J 28 .....	26
2. Comparaisons entre résultats de diagnostic de gestation par dosage de progestérone à J22 ou de PSPB à J28.....	27
3. Concordance entre les résultats de PSPB et ceux de palpation rectale à J70.....	28
III. Niveaux de progestérone et de PSPB, et état de gestation...	28
1. Animaux non gestants; mortalité embryonnaire précoce....	28
2. Mortalité embryonnaire tardive.....	29
3. Concentrations lors de la gestation.....	29
CONCLUSION.....	31
Références Bibliographiques.....	32

## RESUME

Le but principal de cette étude était de connaître, dans les conditions de routine les caractéristiques d'exactitude du diagnostic de gestation par dosage de PSPB 28 jours après des inséminations premières.

En outre, nous désirions savoir comment la persistance de concentrations élevées de PSPB au cours du post-partum pouvait interférer avec le résultat d'un tel test. Pour cela 193 vaches Normandes ont été inséminées environ 70 jours ( $75,6 \pm 32$ ) après vêlage. Chez ces animaux, des échantillons de plasma ont été prélevés le jour de l'insémination (J0), puis à 28 et environ 70 jours de gestation. Une palpation rectale a été effectuée à cette date.

En outre un échantillon de lait a été prélevé au 22ème jour post IA en vue de réaliser un diagnostic précoce de gestation par dosage de progestérone. Les concentrations de progestérone et de PSPB ont été mesurées dans le lait ou le plasma à chacun des stades par dosages radioimmunologiques.

L'élimination de PSPB au cours du post-partum est très lente. Plus de 60% des animaux inséminés entre 60 et 80 jours ont encore des concentrations détectables à J0 .

Après l'insémination les animaux ont été classés en 11 groupes, suivant les résultats des dosages de progestérone, PSPB et de la palpation rectale :

- Groupe 0, les animaux inséminés au mauvais moment et présentant des concentrations de progestérone élevées à J0 (n=5).

- Les animaux à mortalité embryonnaire précoce ou non fécondés pour lesquels le résultat du dosage de progestérone à J22 est négatif. Ces femelles ont été séparées entre 3 sous-groupes; celles n'ayant présenté aucune augmentation de PSPB (groupe 1; n=38); celles ayant présenté des concentrations détectables de PSPB liées à l'apparition d'une nouvelle gestation (groupe 2; n=1) augmentation entre J0 et J28) et celles ayant présenté une sécrétion résiduelle de PSPB au cours du post-partum (groupe 1 bis; n=20).

- Les animaux à mortalité embryonnaire tardive chez lesquels le

résultat du dosage de progestérone à J22 a été positif. Ceux-ci ont été séparés également en 3 sous groupes suivant les résultats de PSPB :

- Groupe 3, n = 7; Groupe 3 bis, n=5 ; Groupe 4, n=3 de la même façon que les femelles ayant présenté une mortalité embryonnaire précoce.

Les animaux chez lesquels le résultat du dosage de progestérone était positif à J22 et trouvés gestants au moment de la palpation rectale ont été divisés en 4 sous groupes, celles n'ayant pas présenté des concentrations de PSPB élevées à J0 et à J28 (groupe 5; n=1); celles chez lesquelles la sécrétion de PSPB résiduelle post partum était importante (groupe 5 bis ; n=49) . Enfin celles ayant présenté une augmentation de PSPB entre J0 et J28 et trouvées gestantes (groupe 6; n= 62) ou ayant avorté après la date de la palpation rectale (groupe 7; n=2).

Dans les groupes, 1 bis, 3 bis et 5 bis la persistance de niveau très élevé de PSPB le jour de l'insémination (8,34+6,98)ng/ml), l'interprétation des résultats a été impossible. L'analyse a été réalisée chez l'ensemble des 119 femelles restantes.

Chez les animaux ayant présenté une mortalité embryonnaire précoce (39/119) ou non fécondés car inséminés à un mauvais moment (5/119) la proportion de femelles chez lesquelles une augmentation de PSPB a été observée a été inférieure à 5% (1/44). Cette proportion a été plus importante chez les femelles à mortalité embryonnaire tardive (30%; 3/10)

Enfin sur l'ensemble des femelles gestantes, une seule vache n'a pas présenté d'augmentation de PSPB à J28 (0,8%).

Au plan zootechnique sur l'ensemble de l'effectif (n=193) l'exactitude des résultats négatifs fournis par le dosage de PSPB à J28 a été proche de 100% quelque soit l'intervalle vêlage lère IA (au total 46/47)

En revanche, l'exactitude des résultats positifs a varié de 65,8% (IA réalisées avant 70 jours; n=102) à 88,9% (IA réalisées plus de 70 jours après l'insémination; n =90).

Ce travail montre que à cause de la persistance de niveaux élevés de PSPB au cours du post partum, l'exactitude des résultats positifs fournis par le dosage de PSPB au 28ème jour n'est proche de 90% que si les inséminations sont réalisées plus de 70 jours après le vêlage. Si les inséminations sont faites plus précocément il est nécessaire d'attendre le 100ème jour post-partum pour obtenir une exactitude semblable.

DIAGNOSTIC DE GESTATION CHEZ LES BOVINS PAR DOSAGE  
D'UNE PROTEINE EMBRYONNAIRE AU 28ème JOUR APRES IA

INTRODUCTION

Depuis plus de 15 ans, le diagnostic de gestation précoce chez les bovins est réalisé par dosage radioimmunologique de la progestérone dans le plasma ou le lait (THIBIER 1974). En effet aucun marqueur spécifique de la gestation tel que l'hCG dans l'espèce humaine n'avait été mis en évidence dans la circulation périphérique. L'utilisation du dosage de progestérone 21 à 24 jours après l'insémination permet de séparer à postériori les cas de mortalité embryonnaire postérieurs au 16ème jour (mortalité embryonnaire tardive) des cas de non fécondation ou de mortalité embryonnaire précoce (HUMBLOT 1986). Dans le premier cas, le corps jaune est maintenu par l'embryon et les concentrations de progestérone plasmatique comme chez les vaches gestantes restent élevées ( $>1.5$  ng/ml) entre le 21ème et le 24ème jour après l'insémination. En revanche si la vache n'a pas été fécondée ou si la mortalité embryonnaire survient avant le 16ème jour, l'insémination est suivie d'une nouvelle ovulation 21 à 24 jours plus tard et la longueur du cycle n'est pas modifiée (NORTHEY et FRENCH, 1980; HUMBLOT et DALLA PORTA, 1984).

Ces éléments permettent d'expliquer pourquoi lorsque l'on compare les résultats fournis par le dosage de progestérone aux mises-bas, la proportion de femelles dont le résultat est positif mettant bas (exactitude des résultats positifs) oscille autour de 70%. A l'inverse la concentration de progestérone étant supérieure à 1,5 ng/ml chez les vaches mettant bas, l'exactitude des résultats négatifs (nombre de femelles non gestantes/ nombre de femelles diagnostiquées vides) est toujours proche de ou égale 100% (HUMBLOT et THIBIER 1984). L'utilisation du dosage de progestérone permet donc de déterminer précocément l'absence de gestation mais toutes les femelles ne mettant pas bas ne seront pas diagnostiquées vides. Le fait que la majorité des pertes embryonnaires soient précoces et antérieures au 16ème jour (AYALON 1978, DISKIN et SREENAN, 1980) explique qu'il soit possible de détecter précocément plus de 50% des femelles non gestantes avec cette méthode.

Récemment une protéine a été isolée à partir d'extraits tissulaires

d'embryons âgés de 25 à 40 jours (BUTLER et al., 1982) et appelée PSPB (pregnancy specific protein B). Les concentrations de cette protéine dans la circulation périphérique au cours de la gestation ont été déterminées par dosage radioimmunologique (SASSER et al., 1986). Les concentrations plasmatiques inférieures à 1 ng/ml avant 30 jours augmentent jusqu'à la parturition pour atteindre des valeurs parfois même supérieures à 700 ng/ml. La diminution des concentrations dans le plasma périphérique se produit lentement après le vêlage (IVANI et al., 1984).

L'exactitude du dosage de cette protéine utilisé à des fins de diagnostic de gestation a été testée chez la vache allaitante entre 30 et 70 jours après la saillie (SASSER et al., 1986). Dans ces conditions, ces auteurs ont rapporté une exactitude de 100% pour des résultats négatifs et supérieure à 90% pour les résultats positifs. Des résultats d'exactitude semblables ont été rapportés chez des vaches laitières inséminées plus de 70 jours après le part et prélevées précocément entre 30 et 35 jours après l'insémination (HUMBLLOT et al., 1988).

Cependant avec l'intensification de la production chez la vache laitière la plupart des inséminations sont réalisées avant le 70ème jour post-partum et il est important d'obtenir pour une méthode de diagnostic de gestation le meilleur compromis précocité-efficacité.

Ces deux éléments nous ont conduits à mener une étude :

1) pour connaître les caractéristiques d'exactitude du diagnostic de gestation par dosage de PSPB 28 jours après des inséminations premières réalisées dans des conditions de routine et 2) savoir comment la persistance de concentrations élevées de PSPB au cours du post-partum pouvait interférer avec le résultat d'un tel test.

## MATERIEL ET METHODES

### I. Animaux

Cette étude a été réalisée chez 193 vaches laitières de race Française Frisonne entre Mai et Avril 1987 dans 180 élevages de l'Ouest de la France.

Les vaches ont été inséminées sur chaleurs naturelles. Seuls les évènements suivant la première insémination ont été analysés. Les inséminations ont été réalisées en moyenne à  $75,6 \pm 32$  (écart-type) jours après vêlage.

Le tableau 1 montre la répartition des inséminations en fonction des différentes classes d'intervalle post-partum.

### II. Interventions et Prélèvements

La séquence des interventions et des prélèvements réalisés est illustrée à la Figure 1.

Les prélèvements de sang ont été réalisés systématiquement le jour de l'insémination puis 28 jours plus tard en vue de dosages de progestérone et de PSPB. Le sang prélevé à la veine ou l'artère caudale dans un vacutainer hépariné (Beckton Dickinson-France) a été centrifugé 15 minutes à 3.200 tours/min. dans les 2h suivant le prélèvement. Le plasma a été recueilli et congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la réalisation des dosages hormonaux.

En outre, un prélèvement de lait a été fait 21-22 jours après l'insémination en vue du diagnostic précoce de gestation par dosage de progestérone.

Le lait provenant des premiers jets de la traite du matin a été récupéré dans un tube contenant un conservateur (Dicromate de Potassium) puis stocké à  $+ 4^{\circ}\text{C}$ .

Chez les animaux non observés en chaleurs dans les 24 jours suivant l'insémination et/ou diagnostiqués gestants par dosage de progestérone dans le lait au 22ème jour, un diagnostic de gestation a été réalisé par palpation rectale après l'I.A. de référence ( $69,9 \pm 3,5$  jours;  $\bar{m} \pm$  écart-type;  $n= 134$ ).

Une prise de sang a été réalisée le jour de la palpation rectale suivant les modalités décrites précédemment en vue des dosages de PSPB et de progestérone.

Tableau 1 : Répartition des insémination en fonction des différentes classes d'intervalle post-partum.

Délai	N	%
< 40	9	4,7
41-50	25	13
51-60	33	17,1
61-70	35	18,1
71-80	22	11,4
81-90	25	12,9
91-100	16	8,3
≥ 100	28	14,5
Total	193	100

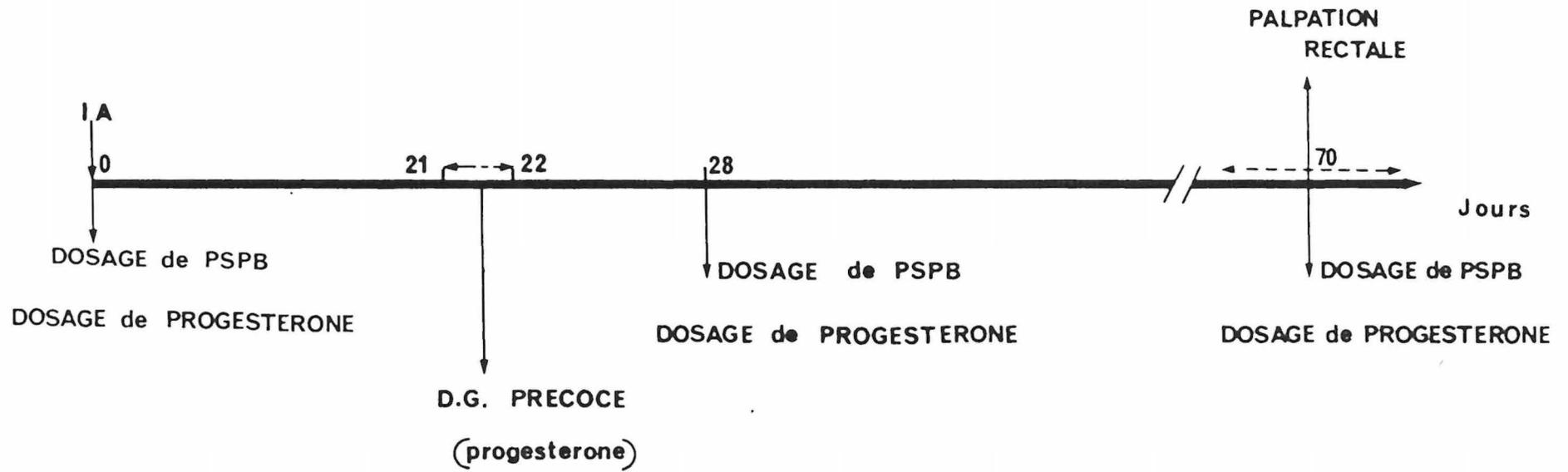


Figure 1 : Séquences des interventions et des prélèvements réalisés.

### III. Dosages Radioimmunologiques

#### 1. Dosages de progestérone dans le lait.

La mesure du taux de progestérone pour le diagnostic précoce de gestation a été effectué selon une méthode dosage dérivant de celle décrite par THIBIER et al., (1976).

Le résultat du diagnostic est déterminé par rapport à deux laits témoins :

- Un lait positif à fort taux de progestérone ( $> 2$  ng/ml).
- Un lait négatif à très faible taux de progestérone ( $\simeq 1$ /ng/ml).

Lorsque les niveaux de progestérone sont intermédiaires, le résultat est dit "douteux".

#### 2. Dosage de Progestérone dans le plasma.

Ce dosage a été effectué selon une méthode dérivant de celle décrite par THIBIER et SAUMANDE (1975). Suivant les concentrations de progestérone dans l'échantillon étudié ont été distingués les résultats négatifs ( $< 1,5$  ng/ml) et positif ( $> 1,5$  ng/ml).

Pour les dosages de la progestérone aux stades J28 et J70 une chromatographie sur colonne de l'extrait plasmatique a été réalisée pour séparer la progestérone des autres stéroïdes.

#### 3. Dosages de PSPB

Le dosage a été réalisé au laboratoire de dosages hormonaux de l'UNCEIA.

La méthode de dosage s'apparente au dosage de gonadotropines. Les critères de validité de la méthode ont été décrits, par SASSER et al., (1986). Le dosage a été réalisé en double à partir d'aliquotes de 100  $\mu$ l de plasma.

L'antiserum anti PSPB préparé sur lapin (R.G.S. 38-1) a été utilisé à la dilution finale de 1:300.000. Les caractéristiques de spécificité de ce dosage ont été illustrées précédemment (SASSER et al., 1986). Ces auteurs ont montré l'absence de réaction croisée avec l'ensemble des hormones protéiques testées (bPRL, bTSH et bGH) et la faible réaction croisée avec la LH bovine (0,5%).

La limite de détection du dosage a été estimée à 0,10 ng/ml (préparation R-37) et correspond à un déplacement de 5% du pourcentage de liaison de l'hormone radioactive avec l'anticorps .

Dans l'attribution des résultats de diagnostics de gestation tous les prélèvements pour lesquels au moins un des doubles était supérieur à 90% ont été déclarés négatifs.

#### IV. Analyse des données

##### 1. Interprétation des résultats

Suivant les concentrations de progestérone et de PSPB à JO et J28 et au moment de la palpation rectale, les retours en chaleurs et les résultats de la palpation rectale les animaux ont été classés en 11 groupes (Tableau 2).

Les animaux pour lesquels une discordance existait entre palpation rectale et PSPB ont fait l'objet d'une nouvelle palpation rectale et d'une prise de sang 20 à 30 jours plus tard.

A part les animaux inséminés à un mauvais moment (groupe 0) nous avons distingué dans l'interprétation :

a) Les animaux à mortalité embryonnaire précoce ou non fécondés pour lesquels le résultat du dosage de progestérone à J21 est négatif. Ces femelles ont été séparées en 3 sous-groupes; celles n'ayant jamais présenté d'augmentation de PSPB (groupe 1); celles ayant présenté des concentrations détectables de PSPB liées à l'apparition d'une nouvelle gestation (groupe 2; augmentation entre JO et J28) et celles ayant présenté une sécrétion résiduelle de PSPB au cours du post-partum (groupe 1 bis).

b) Les animaux à mortalité embryonnaire tardive chez lesquels le résultat du dosage de progestérone à J22 a été positif. Ceux-ci ont été séparés également en 3 sous-groupes suivant les résultats de PSPB (3,3bis,4) de la même façon que les femelles ayant présenté une mortalité embryonnaire précoce.

c) Les animaux chez lesquels le résultat du dosage de progestérone était positif à J22 et trouvés gestants au moment de la palpation rectale

Ces femelles ont été divisées en 4 sous groupes, selon les concentrations de PSPB à JO et J28, celles n'ayant pas présenté d'augmentation de PSPB à J28 bien que gestantes (groupe 5). Celles ayant présenté des concentrations de PSPB élevées à JO et à J28 (groupe 5 bis) et chez lesquelles la sécrétion de PSPB post-partum était donc importante. Enfin celles ayant présenté une augmentation de PSPB entre JO et J28 et trouvées finalement gestantes (groupe 6) ou ayant avorté après la date de la palpation rectale (groupe 7).

Tableau 2 : Différents groupes d'animaux distingués après l'insémination suivant les résultats de dosage de progestérone et de PSPB.

PSPB (JO)	Progestérone (J22)	PSPB (J28)	Groupes
-	-	-	0 et 1
(±)	-	+	2
-	+	-	3
(±)	+	+	4
-	+	-	5
-	+	+	6 et 7
+	-	+	1 bis
+	+	(±)	3 bis
+	+	+	5 bis

## PLAN DES RESULTATS

- I. Evolution de la PSPB post-partum
  
- II. Résultats d'exactitude des diagnostics de gestation par dosage de PSPB
  
- III. Répartition des animaux suivant les concentrations de progestérone et de PSPB. Etude de la mortalité embryonnaire.

## RESULTATS

### I. Evolution de la PSPB post partum

#### 1. Description de la régression des concentrations de PSPB en fonction du temps.

Nous avons étudié la régression des concentrations de PSPB en fonction des jours après vêlage. Un polynome du 4ème degré a été le plus adapté aux données (Figure 2).

Les concentrations de cette courbe sont nettement décroissantes au fur et à mesure que les jours augmentent. A partir de 75 jours après le vêlage, le nombre des animaux ayant encore de la PSPB résiduelle détectable est très faible.

#### 2. Répartition des vaches PSPB positives à J0 en fonction du temps post-partum.

Les vaches ont été classées selon l'intervalle vêlage lère IA (Tableau 3). Pour chaque groupe, les concentrations moyennes de PSPB ont été mesurées ainsi que la fréquence des animaux chez lesquels la PSPB est détectable. Les 9 vaches qui ont été inséminées avant ou à 40 jours post-partum ont eu de la PSPB détectable à J0 (100%). La concentration moyenne est de 21,72 ng/ml. La fréquence des vaches dont la PSPB est détectable le jour de l'IA décroît régulièrement pour atteindre 14,8% après 100 jours post-partum; la concentration moyenne est de 0,50 ng/ml.

Au total, 66,8% (129/193) des vaches ont présenté des concentrations de PSPB détectables le jour de l'I.A.

#### 3. Etude de la fertilité de l'échantillon suivant les concentrations de PSPB le jour de l'insémination.

À la suite des 193 inséminations réalisées, 111 vaches ont été gestantes (Tableau 4). Le taux global de fertilité a donc été de 57,5%. On peut observer une tendance à l'augmentation de la fertilité lorsque l'insémination est faite après 70 jours post-partum. Cependant les pourcentages observés ne sont pas significativement différents.

On remarque aussi que la fertilité ne varie pas lorsque les concentrations de PSPB sont élevées ou pas le jour de l'I.A.

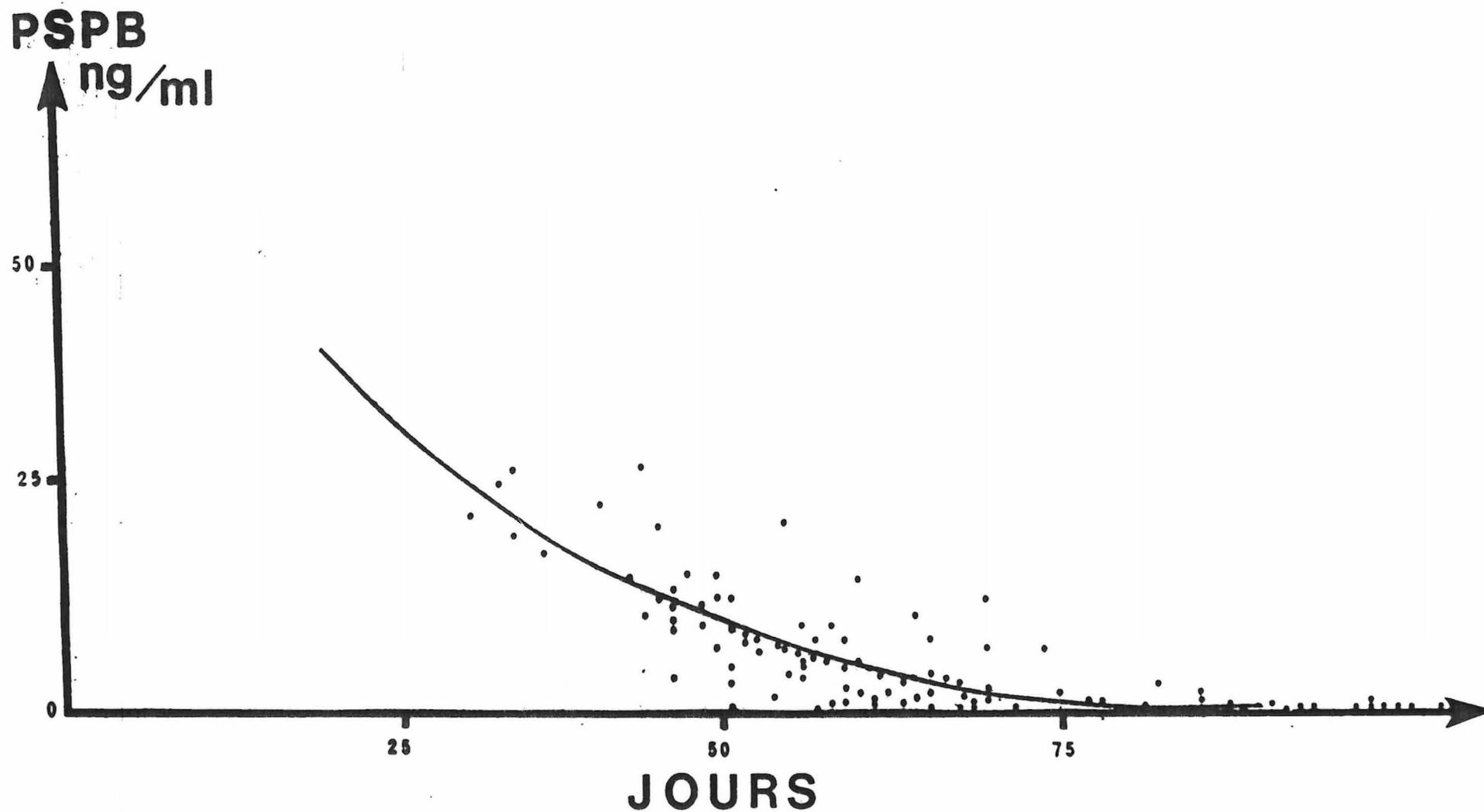


Figure 2 : Régression des concentrations de PSPB le jour de l'IA en fonction du délai par rapport au velâge (jours)  
( $Y = 79.8 - 2.66 x + 0.032 x^2 - 1,63 \cdot 10^{-4} x^3 + 2,98 \cdot 10^{-7} x^4$ ;  $r = 0,856$ )

Tableau 3 : Pourcentages des vaches dont la bPSPB est détectable à JO; effet de l'intervalle vêlage Insémination Artificielle sur les concentrations moyennes.

Intervalle vêlage IA (Jours)	Total	Résultats positifs		$\bar{X}$ ng/ml	s
	N	N	%		
≤ 40	9	9	100	21,72	± 3,67
41-50	25	24	96	10,12	± 6,36
51-60	33	32	96,9	6,09	± 5,23
61-70	35	31	88,8	2,62	± 2,73
71-80	22	14	63,6	1,05	± 0,84
81-90	25	9	36	0,63	± 0,25
91-100	16	6	37,5	0,67	± 0,38
> 100	28	4	14,8	0,50	± 0,21
Total	193	129	66,8		

Tableau 4 : Fertilité suivant concentration de PSPB à JO en fonction des jours post-partum (P.P.)

Jours Post-Partum	Résultat PSPB Négatif		Résultat PSPB Positif		Total	
	N	%	N	%	N	%
	≤ 70	3/6	50	51/96	53,1	54/102
71-90	12/24	58,3	16/23	69,6	30/47	63,8
> 90	19/33	57,6	8/11	72,7	27/44	61,4
Total	36/63	57	75/130	57,7	111/193	57,5

## II. Résultats d'exactitude du diagnostics de gestation par dosage de PSPB.

### 1. A J28

Dans cette analyse, les animaux ont été séparés en deux groupes selon l'intervalle vêlage-lère I.A. (Tableau 5).

Chez les vaches inséminées avant ou à 70 jours post-partum, l'exactitude des résultats positifs a été de 65,1%. Ce pourcentage est significativement plus élevé (88,7% ;  $p < 0,01$ ) chez les vaches inséminées après 70 jours. Au total on a obtenu le taux d'exactitude des résultats positifs de 75,2%. Après correction, en supprimant du calcul les animaux dont les niveaux de PSPB le jour de l'I.A. étaient élevés, l'exactitude dans le groupe de vaches inséminées avant 70 jours atteint 88,5%. Peu de vaches inséminées après 70 jours ( $n=2$ ) avaient des niveaux élevés à J0. Ainsi dans ce groupe l'exactitude varie peu et atteint 91,7%.

Pour les résultats négatifs, l'exactitude a été de 100% chez les animaux inséminés avant 70 jours et de 96,4% chez ceux inséminés après.

Au total l'exactitude des résultats négatifs a été de 97,8%.

### 2. Comparaison avec les résultats d'exactitude du diagnostic de gestation par dosage de progestérone.

Nous avons comparé l'exactitude et la fiabilité des résultats fournis par les dosages de progestérone (J22) et de PSPB (J28). (Tableau 6).

Pour les dosages de PSPB à J28, nous n'avons pris que les animaux inséminés après le 70ème jour post-partum.

L'analyse entre les résultats a été faite suivant le résultat positif ou négatif de chaque dosage (P4 J22 et PSPB J28).

L'exactitude des résultats positifs a été de 82,6% par dosage de progestérone et de 88,7% pour le dosage de PSPB.

Pour les résultats négatifs les pourcentages ont été respectivement de 100% et de 96,4% pour les dosages de progestérone et de PSPB.

La fiabilité du diagnostic de gestation par dosage de progestérone pour les vaches gestantes a été de 98%. En effet sur 102 vaches gestantes, 100 ont été détectées par le dosage de progestérone. La fiabilité obtenue après dosage de PSPB est à peu près la même (98,2%); avec ce test ont été détectées 55 vaches sur l'ensemble des 56 vaches gestantes.

La fiabilité des dosages de progestérone et de PSPB pour les vaches non

Tableau 5 : Exactitude du diagnostic de gestation par dosage de PSPB 28 jours après I.A.; Effet de l'intervalle vêlage insémination

Intervalle Velâge-IA (Jours)	N	Résultats positifs				Résultats négatifs	
		Exact		Exact.Cor.		%	N
		%	N	%	N		
≤ 70	102	65,1	(54/83)	88,5	(54/60)	100	(19/19)
> 70	90	88,7	(55/62)	91,7	(55/60)	96,4	(27/28)
Total	192*	75,2	(100/145)	90,1	(109/121)	97,9	(46/47)

(\* ) Une vache n'a pas eu de résultat de dosage de PSPB au 28ème jour.

Tableau 6 : Comparaison des résultats d'exactitude et de fiabilité après dosage de progestérone dans le lait au 22ème jour (P4) et dosage du PSPB\* à J28.

		Résultat définitif			
Résultat	Analyse	Gestantes	Non Gestantes	T	Exactitude %
Test					
+	P4	100	21	121	82,6 %
	PSPB	55	7	62	88,7 %
-	P4	0	37	37	100%
	PSPB	1	27	28	96,4%
douteux	P4	2	2	4	
	PSPB	0	0	0	
T	P4	102	60	162	
	PSPB	56	34	90	
Fiabilité %	P4	98%	61,6%		
	PSPB	98,2%	79,4%		

\* (pour les inséminations réalisées après le 70ème jour post-partum).

gestantes est moins bonne; 61,6% avec le dosage de progestérone et 79,4% avec le dosage de PSPB.

### 3. Comparaison du dosage de PSPB 70 jours après l'IA avec les résultats de palpation rectale.

La concordance entre les résultats de palpation rectale (J70) et le diagnostic par dosage de PSPB à J70 a été élevée (87,6%) (Tableau 7).

En revanche, dans 7,4% des cas, aucun résultat n'a pu être fourni par palpation rectale à 70 jours. Dans ces cas, nous avons pu constater, après confirmation à 130 jours, que les résultats de diagnostic fournis par le dosage de PSPB ont été exacts; 7 animaux gestants/7 résultats positifs; seul 1 avortement a été constaté ultérieurement. Enfin, les 2 vaches diagnostiquées vides étaient bien non gestantes.

Les résultats de discordance totale représentent 5% du total des cas. On remarque après confirmation que l'exactitude des résultats de diagnostic de gestation par dosage de PSPB à J70 a été de 100% aussi bien pour les résultats positifs que pour les résultats négatifs.

### III. Répartition des animaux suivant les concentrations de progestérone et de PSPB. Etude de la mortalité embryonnaire.

Dans la répartition des animaux dans les différents groupes, seuls ceux dont la concentration de PSPB était faible le jour de l'insémination (Tableau 8) ont été utilisés (n=119). Cinq vaches (4,2%) ont présenté un niveau de progestérone élevé le jour de l'insémination (groupe 0). Les concentrations de P4 à J22 et J28 ont été élevées pour tous ces animaux. Les niveaux de PSPB à J28 sont faibles (Tableau 9).

Par rapport au total des vaches négatives en PSPB à J0, 32,7% ont présenté une absence de fécondation ou une mortalité embryonnaire précoce (groupes 1 et 2). En effet, 39 animaux ont eu un diagnostic de gestation précoce par dosage de progestérone dans le lait au 22ème jour négatif et/ou des chaleurs observées avant cette date. Parmi ceux-ci, seule une vache a eu des concentrations de PSPB plus élevées à J28 qu'à J0.

La fréquence des cas de mortalité embryonnaire tardive a été de 8,4% (groupes 3 et 4). En effet, 10 femelles qui ont eu des concentrations de progestérone élevées à J22 sont revenues en chaleurs plus de 24 jours après l'insémination

Tableau 7 : Résultats de concordance entre les résultats de PSPB et ceux fournis par palpation rectale (P.R.) 70 jours après l'insémination de référence.

Résultat Diagnostic		N	%		Résultat après confirmation (a)
PSPB	P.R.				
+	+	98	81	} 87,6	97 gestantes (b)
-	-	8	6,6		8 non gestantes
+		7	5,8	} 7,4	6 gestantes (b)
-		2	1,6		2 non gestantes
+	-	5	4,2	} 5	5 gestantes
-	+	1	0,8		1 non gestante
Total		121	100		

(a) mise-bas ou nouveau diagnostic à 130 jours de gestation

(b) plus 1 avortement

(c) résultat de palpation rectale douteux

Tableau 8 : Répartition de PSPB l'échantillon suivant les différentes situations après l'insémination.

Groupes	Interprétation	N	% PSPB - (JO)
0	I.A. mauvais moment	5	4,2
1	Non fécondation ou précoce (M.E.P.) sans PSPB (J28)	38	31,9
2	Mortalité embryonnaire précoce (M.E.P.) avec PSPB (J28)	1	0,8
3	Mortalité embryonnaire tardive (M.E.T.) sans PSPB (J28)	7	5,9
4	Mortalité embryonnaire tardive (M.E.T.) avec PSPB (J28)	3	2,5
5	Gestation sans PSPB (J28)	1	0,8
6	Gestation avec PSPB (J28)	62	52,2
7	Avortement foetal Gestation avec PSPB J28	2	1,7
Total		119	100%

Tableau 9 : Fréquence de différentes situations après IA suivant les concentrations de progestérone PSPB (m + e.t.), et résultats de palpation rectale (R.P.) chez les animaux avec une concentration de PSPB basse ou non détectable au moment de l'IA (Jour 0)

Groupe	N (%)	Progesterone			PSPB			Résultats PR
		Jour 0	Jour 22	Jour 28	Jour 0	Jour 28	PR	
0	5 4,2	+	+	7,6 ± 4,9	3,2 ± 4,5	0,6 ± 0,2		
1	38 31,9	-	-	3,5 ± 2,9	1,5 ± 1,9	0,5 ± 0,1		
2	1 0,8	-	-	1,8	0,7	0,9		
3	7 5,9	-	+	2,7 ± 2,7	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1		-
4	3 2,5	-	+	3,4 ± 3,9	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,3	0,4 ± 0,03	-
5-6	63 52,9	-	+	9,6 ± 5,2	0,6 ± 0,3	1,5 ± 0,5 <sup>**</sup>	3,2 ± 1,9	+
7	2 1,7	-	+	14,7 ± 0,1	1 ± 0,2	1,4 ± 0,5	0,9 ± 0,1	

(\*\*) Seulement un animal dans ce groupe a eu une concentration non détectable de PSPB à J28.

ou ont été détectées non gestantes au moment de la palpation rectale.

Parmi celles-ci 3 ont eu une élévation de PSPB à J28 mais les concentrations sont retombées à des niveaux très faibles au moment de la palpation rectale. (Tableau 9 ).

Plus de 54% des vaches ont été gestantes au moment de la palpation rectale. Parmi celles-ci seule une femelle a présenté des concentrations de PSPB faibles à J28 et avait été diagnostiquée négative. Chez les autres, les concentrations sont en moyenne de 1,45 ng/ml à J28 et supérieures à 3 ng/ml à J70 (Tableau 9).

Enfin, 2 vaches gestantes au moment de la palpation rectale ont avorté tardivement. Les concentrations de PSPB à J28 sont tout à fait semblables à celles des animaux gestants.

Des analyses complémentaires ont été effectuées pour préciser les différences entre concentrations moyennes selon les différentes situations après l'insémination.

Au 28ème jour, les concentrations de progestérone pour l'ensemble des animaux gestants (groupes 5-7) ont été très supérieures (tableau 10,  $p < 0,0001$ ) à celles observées chez les vaches non gestantes au moment de la palpation rectale (groupes 0-3).

En outre, (tableau 11) les concentrations de PSPB à J28 ont été significativement plus élevées chez les vaches gestantes (groupes 5-7) que chez celles des groupes 2-4. Les vaches du groupe 4 présentant cependant une concentration moyenne très voisine de celle des vaches gestantes (Tableau 9 ).

Enfin, lorsque la totalité des animaux gestants au moment de la palpation rectale sont pris en compte, on remarque que les femelles ayant présenté un avortement très tardif (Tableau 12) ont des concentrations de PSPB bien inférieures ( $p < 0,05$ ) à celles des vaches mettant bas.

Tableau 10 : Comparaison des concentrations de progestérone au 28ème jour chez les animaux trouvés ultérieurement non gestants au moment de la palpation rectale (groupes 0-4) et chez les animaux gestants ou ayant présenté un avortement tardif (groupes 5-7).

Types d'animaux	Concentrations de Progesterone à J28		
	N	m	e.t
Non gestants	78 (*)	4,14 a	± 3,35
Gestants	111 (*)	9,42 b	± 4,85

(\*) Chez quatre vaches supplémentaires (2 gestantes et 2 non gestantes) le dosage de progesterone n'a pu être réalisé au 28ème jour.

a vs b,  $P < 0.0001$

Tableau 11: Comparaison des concentrations de PSPB au 28ème jour chez les animaux non gestants sans sécrétion post-partum (groupes 2,3,4) et les animaux gestants ou ayant présenté un avortement tardif (M.E.T.) (groupes 5-7).

Types d'animaux	N	Concentrations de PSPB à J28	
		m	e.t.
Non gestants	12	0,73 a	± 0,32
Gestants ou avortement tardif	113	1,58 b	± 0,89

a vs b,  $P < 0,01$

Tableau 12 : Comparaison des concentrations de PSPB au 70ème jour chez les animaux gestants au moment de la palpation rectale (groupes 5-6) et chez les animaux qui ont eu un avortement tardif (groupe 7).

Types d'animaux	Concentrations de PSPB à J70 ng/ml		
	N	m	e.t.
gestants	110(*)	3,11 a ±	2,02
avortement tardif	2	0,95 b ±	0,12

(\*) Une vache gestante n'a pas été prélevée au moment de la palpation  
a vs b  $P < 0,05$ .

## DISCUSSION

### I. Evolution des concentrations de PSPB au cours du post-partum ; relation avec la fertilité ultérieure.

Plus de 66% des vaches ont présenté des concentrations de PSPB élevées au moment de l'insémination, tout spécialement chez celles inséminées avant 70 jours post-partum.

Nos résultats confirment ceux obtenus par RUDER et SASSER 1987. Cette élimination lente de la PSPB dans le plasma périphérique (après le velâge) pourrait s'expliquer selon RUDER et SASSER 1986 par la persistance de résidus de tissus placentaire dans les caroncules utérines après le velâge; les résidus pouvant continuer à libérer des quantités non négligeables de PSPB. Il semble en effet que même si les concentrations au moment du velâge sont très élevées (elles avoisinent 700 ng/ml) la durée demi vie de l'ordre de 7 jours ne suffise pas à expliquer à elle seule cette persistance de niveaux élevés de PSPB.

Enfin, il ne semble pas exister et ceci est une information nouvelle de relation entre les concentrations de PSPB observées le jour de l'insémination et la fertilité ultérieure des animaux. Ainsi on ne peut pas considérer que l'absence de PSPB le jour de l'IA soit un bon témoin de l'involution utérine si on admet comme cela a été montré par CHAFFAUX et al., 1981, que l'involution est liée à la fertilité en lère I.A.

### II.Exactitude du diagnostic de gestation par dosage de PSPB

#### 1. A J28

L'exactitude des résultats positifs fournis par le dosage de PSPB à J28 est de 75%, c'est à dire du même ordre de grandeur que celle obtenue classiquement par dosage de progestérone entre J21 et J24 (THIBIER et al., 1978, COX et al., 1978, GOWAN et ETCHES , 1979, BOOTH ,1979, LAING et al., 1980, INAUDI et al., 1982, et enfin HUMBLLOT et THIBIER , 1984).

Nos données montrent très clairement que l'existence de concentrations élevées le jour de l'IA, ce qui se produit tout spécialement chez les animaux inséminés avant 70 jours post-partum, vient interférer avec le résultat obtenu au 28ème jour. Après correction pour de tels animaux, ce pourcentage d'exactitude atteint 90% et est tout à fait semblable à ceux obtenus par MAURER et al., 1985, SASSER et al.,1986 et HUMBLLOT et al., 1988 à des stades

un peu plus tardifs de gestation.

L'exactitude des résultats négatifs est très proche de 100%. Seule une vache a été diagnostiquée négative à tort. Ceci illustre comme cela avait été montré par les auteurs précédents que le moment où la PSPB augmente est suffisamment variable pour que avant le 30ème jour certains animaux présentent encore des concentrations non détectables.

2. Comparaisons entre résultats de diagnostic de gestation par dosage de progestérone à J22 ou de PSPB à J28.

Nous avons observé une exactitude de 82,6% pour les résultats de diagnostics positifs par dosage de progestérone à J22. THIBIER et al., 1978 avaient obtenu des résultats similaires ainsi que de nombreux autres auteurs tels que BOOTH 1979, LAING et al., 1980, INAUDI et al., 1982. Mais ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par HUMBLLOT et THIBIER, 1984, sur des grands effectifs, ainsi que COX et al., 1978, GOWAN et ETCHES, 1979.

Par dosage de PSPB à J28, l'exactitude des diagnostics positifs a été légèrement supérieure (88,7%) sur l'ensemble des animaux ayant présenté des concentrations faibles à JO.

La différence entre exactitude des résultats positifs par dosage de progestérone et de PSPB est plus faible que dans un travail précédent (HUMBLLOT et al., 1988a). Ceci peut s'expliquer par le fait que le stade de prélèvement dans notre travail soit un peu plus précoce; dans ce cas, la probabilité d'avoir un avortement embryonnaire postérieur au 28ème jour et nécessairement plus forte qu'après le 35ème jour et l'exactitude peut être un peu plus faible. Le deuxième élément expliquant vraisemblablement la plus grande part de cette différence est le taux de mise bas de notre échantillon supérieur de plus de 10 points par rapport à l'étude précédente. Comme dans ce cas le taux de mortalité embryonnaire avec maintien de concentration de progestérone a tendance à diminuer (HUMBLLOT, 1986), il est logique de constater une moindre différence entre l'exactitude des résultats fournis par dosage de PSPB et de progestérone.

Ceci explique d'ailleurs que dans cette expérience l'aptitude à la détection des animaux non gestants (fiabilité) ait été peu différente par les 2 méthodes contrairement à ce qui avait été observé précédemment, (HUMBLLOT et al., 1988a).

### 3. Concordance entre les résultats de PSPB et ceux de palpation rectale à J70.

Pour les 121 animaux soumis à un diagnostic de gestation par dosage de PSPB à J70, aucun résultat n'a été contraire aux résultats obtenus après confirmation (mise-bas ou nouveau diagnostic à 130 jours de gestation). Seuls 2 cas d'avortements ont été observés après le 70ème jour. En revanche, après palpation rectale à J70, chez 9 animaux le diagnostic n'a pas été possible (diagnostic douteux) et 6 (5%) diagnostics ont été erronés.

Le diagnostic de gestation par dosage de PSPB à J70 apporte des résultats dont l'exactitude est très proche de 100% aussi bien pour les négatifs que les positifs.

Ceci confirme les résultats obtenus par SASSER et al., 1986 et HUMBLLOT et al., 1988a.

### III. Niveaux de progestérone et de PSPB, et état de gestation.

#### 1. Animaux non gestants; Mortalité embryonnaire précoce.

La reprise du cycle chez les animaux dont les concentrations de progestérone étaient faibles à J22 et (ou revenues en chaleurs avant J24, est caractérisée par une augmentation de la progestérone à J28. Ceci équivaut à J7 d'un nouveau cycle. A ce stade, les niveaux sont semblables à ceux décrits par SCHAMS et al., (1977).

Tout porte à croire que ces animaux ont été sujets à une non fécondation lors de l'insémination artificielle de référence ou bien à une mortalité embryonnaire précoce avant J16. Il n'est pas possible, avec les concentrations de progestérone, de distinguer les deux situations.

En effet comme le montre les expériences conduites par NORTHEY et FRENCH, 1980 et HUMBLLOT et al., 1982, la disparition du produit de conception avant J16 n'allonge pas l'activité lutéale cyclique.

Nos données confirment que par rapport à l'ensemble des échecs de gestation, la mortalité embryonnaire précoce ou les cas de non fécondation sont les causes les plus fréquentes. Ceci rejoint les observations faites par AYALON, 1978 et HUMBLLOT, 1986.

L'analyse des concentrations de PSPB a montré que parmi ces vaches deux situations sont possibles:

La plus fréquente est le cas où aucune élévation de PSPB n'est observée. Ceci confirme la spécificité de la PSPB à la gestation comme l'avait souligné IVANI et al., (1984).

On pourrait penser que le dosage de cette protéine puisse servir à séparer les cas de non fécondation des cas de mortalité embryonnaire précoces (groupe 2; animaux avec PSPB à J28). Les premières élévations de concentrations de PSPB ont en effet été rapportées dès J15 (IVANI et al., 1984), mais la variabilité de ce moment d'apparition chez les vaches gestantes interdit toute interprétation dans ce sens.

## 2. Mortalité embryonnaire tardive

Les résultats de diagnostic précoce et les concentrations moyennes de progestérone chez les animaux des groupes 3 et 4 illustrent bien la lutéolyse tardive survenue après 24 jours. En effet on peut observer que même à J28, on trouve une concentration moyenne, de progestérone plasmatique élevée.

Cependant les concentrations de progestérone et de PSPB de ces animaux sont plus faibles que chez les femelles qui restent gestantes. Ceci indique que chez les animaux qui présentent une mortalité embryonnaire tardive, un signal antilutéolytique est fourni mais la sécrétion de progestérone est inférieure à celle des animaux qui restent gestants. Il faut néanmoins préciser que cette différence est plus importante vis à vis des femelles chez lesquelles la PSPB n'a pas été détectée, (groupe 3).

Ceci signifie que pour les dernières (groupe 3), la stimulation lutéale est moins forte que chez les animaux pour lesquels la PSPB d'origine trophoblastique a été trouvée (classe 4). Des données allant dans ce sens avaient été précédemment obtenues par HUMBLLOT et al., 1988b.

En outre, chez les animaux ayant présenté une mortalité embryonnaire (groupes 2,3 et 4) nous avons des concentrations de PSPB à J28 inférieures à celles relevées chez les gestantes ou ayant présenté un avortement tardif.

## 3. Concentrations lors de la gestation

La concentration moyenne de progestérone chez les 113 femelles gestantes ou ayant présenté un avortement tardif est 9,42 ng/ml, donc à peu près équivalent à celui décrit par HUMBLLOT, 1981.

L'évolution des concentrations de protéine B chez les animaux gestants entre JO est semblable à celle décrite par SASSER et RUDER (1986) ou HUMBLLOT et al., 1988b.

Les concentrations de progestérone à J28 sont significativement plus élevées chez les animaux gestants (ou ayant présenté un avortement tardif que chez les animaux non fécondés et/ ou ayant présenté une mortalité embryonnaire) ;(groupes 0 à 4). Ceci confirme comme l'avait évoqué les

études in vivo de LUKASZEWSKA et HANSEL (1980) à des stades plus précoces ou de HUMBLLOT (1981), que l'activité lutéale dépend du développement embryonnaire.

Enfin, il semble, mais cela mériterait confirmation sur de plus grands effectifs qu'en cas d'avortement tardif les concentrations de PSPB à J70 sont très inférieures à celles de vaches mettant bas et sont mêmes inférieures à la concentration moyenne observées à J28. Ceci montre bien que les concentrations de PSPB sont un bon reflet de la viabilité de l'embryon ou du fœtus.

## CONCLUSION

Au plan physiologique :

L'élimination de PSPB au cours du post-partum est très lente. Plus de 60% des animaux inséminés entre 70 et 80 jours ont encore des concentrations détectables A J0.

La fréquence des femelles non gestantes ayant présenté une augmentation de PSPB (indépendante de la sécrétion post-partum) est très faible ( 4% du total des inséminations).

Les mortalités embryonnaires tardives (maintien de la sécrétion de progestérone au delà du 21ème jour) représentent seulement 8,4% du total des IA ou 20% des échecs .

Les femelles gestantes ont dès le 28ème jour des concentrations de PSPB supérieures à celles des femelles diagnostiquées non gestantes ultérieurement.

Au plan pratique:

Avec le dosage de PSPB au 28ème jour lorsque les inséminations sont réalisées au delà du 70ème jour post-partum on obtient une exactitude voisine de 90% pour les résultats positifs et de 100% pour les négatifs.

L'exactitude de ces résultats est beaucoup moins bonne (65%,PSPB J28) et le dosage de PSPB n'apporte aucune amélioration par rapport au dosage de Progestérone lorsque les inséminations sont réalisées plus précocément.

Si des IA précoces sont réalisées, le dosage de PSPB peut être utilisé à des fins de diagnostic de gestation mais après le 100ème jour post-partum.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AYALON N. (1978). A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fert.* 54: 483-493
- BOOTH J.M. (1979). Milk progesterone testing: Application to herd management. *J. Dairy. Sci.* 62: 1829-1834.
- BUTLER J.E., HAMILTON W.C., SASSER R.G., RUDER C.A., HASS G.M. et WILLIAMS R.J. (1982). Detection and Partial characterization of two bovine pregnancy specific proteins. *Biol. Reprod.* 26: 925-933.
- CHAFFAUX S., LOKHANDE S., BOUISSET S., DAVIAUD L., et HUMBLOT P. (1981) Les métrites chroniques de la vache. Essais de traitements . *In* : *Rec. Med. Vet.* 1981. 157 : 105-115.
- COX N.M., THOMPSON F.N., CULVEZER D.H. (1978). Milk progesterone to Predict Reproductive Status in a Commercial Dairy Herd. *J. Dairy Sci.* 61: 1616-1621.
- DISKIN H.G. and SREENAN J.R. (1980). Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fert.* 59: 463-468.
- GOWAN E.W. and ETCHES R.J. (1979). A solid phase Radioimmunoassay for Progesterone and its application to pregnancy diagnosis in the cows *Theriogenology.* 12 (6): 327-343.
- HUMBLOT P. (1981). Physiologie de la reconnaissance embryo maternelle chez la vache. *Rec. med. Vet.* 157: 39-52.
- HUMBLOT P. (1986). La mortalité embryonnaire chez les bovins. In *Recherches sur l'épidémiologie de la fertilité.* MASSON Ed. Paris Colloque de la Société Française pour l'Etude de la Fertilité: 213-242.
- HUMBLOT P. and DALLA PORTA M.A. (1984). Effect of conceptus removal and intrauterine administration of conceptus tissue on luteal function in the cow. *Reprod. Nutr. Develp.* 24: 529-541.
- HUMBLOT P. et THIBIER M. (1984). Evaluation comparée des méthodes de diagnostic de gestation chez les bovins. *Elev. Insem.* 200 3-18.
- HUMBLOT P., DALLA PORTA M.A. et SCHWARTZ J.L. (1982). Etude de la mortalité embryonnaire. *Elev. Insem.* 194: 3-12.

- HUMBLOT P., CAMOUS S., MARTAL J., CHARLERY J., JEANGUYOT N., THIBIER M., and SASSER G., (1988a). Diagnosis of Pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy specific protein in the plasma of dairy cows. *Theriogenology*. (Soumis à publication).
- HUMBLOT P., CAMOUS S., MARTAL J., CHARLERY J., JEANGUYOT N., THIBIER M. and SASSER R.G. (1988). Pregnancy specific protein B, Progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fert.* (Sous presse)
- INAUDI P., BACIGALUPO M., MONITTOLO C., GENAZZANI A.R. (1982). Pregnancy Diagnosis in cattle by a rapid and highly reliable method for progesterone determination in milk. *J. Reprod. Fert.* 65:265-273.
- IVANI K.A., RUDER C.A., SASSER R.G. (1984a). Serum concentration of a bovine pregnancy specific protein during gestation. *J. Anim. Sci.* 59: 367, Abstract.
- IVANI K.A., RUDER C.A. et SASSER R.G. (1984b). Diagnosis of Pregnancy of radioimmunoassay of a pregnancy specific protein in serum of the cow. *Bio. Reprod.* (1984) 30 : 51
- KNIKERBOKER J.J., THATCHER W.W. , BAZER F. W., DROST M. , BARRON D. H. , FINCHER K. B. et ROBERTS R. M. (1984). Proteins secreted by cultured day 17 bovine conceptus extend luteal function in cattle. 10th Int. Congr. Anim. Rep. and AI June 10, 1984. Article 88.
- LAING H.A., GIBBS H.A., EASTMAN S.A.K. (1980). A herd test for pregnancy in cattle based on progesterone levels in milk. *Br. Vet. J.* 136: 413-415.
- LUKASZEWSKA J., HANSEL W. (1980). Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 60: 485-493.
- MAURER R.R., RUDER C.A., SASSER R. G., (1985). Effectiveness of the Protein B radioimmunoassay to diagnose pregnancy in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 61: 390 Abstract.
- NORTHEY D.L. and FRENCH L.G R. (1980). Effect of embryo removal and intra-uterine infusion of embryonic homogenates of the lifespan on the bovine corpus luteum. *J. Anim. Sci.* 50:298-302.
- REIMERS T.J., RUDER C. A. and SASSER R. G. (1985). Production of pregnancy specific protein B bPSPB by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* 32: (Suppl. 11),65 Abstr.

- RUDER C.A. and SASSER R.G. (1986). Source of bovine pregnancy-specific protein B (bPSPB) during the postpartum period and estimation of half-life of bPSPB. Annual meeting Am. Soc. Anim. Sci. J. Anim. Sci. 63: 335, suppl.1.
- SASSER R.G., RUDER C.A., IVANI K.A., (1986). Pregnancy detection in farm animals by radioimmunoassay of a pregnancy specific Protein in serum. In: "Pregnancy Proteins in Animals". Ed Walter de Gruyter & Co : 511-515.
- SCHAMS D., SCHALLENBERGER E., HOFFMANN B., H.KARG (1977). The oestrous cycle of the cow : hormonal parameters and time relationships concerning oestrus, ovulation, and electrical resistance of the vaginal mucus. Acta Endocr. 86: 180-192.
- THIBIER M. (1974). La progestérone dans le lait de vache. Diagnostic précoce de gestation. Elev. Insem. (1974) 144 : 27-32.
- THIBIER M., PETIT M., HUMBLLOT P. (1978) Use of progesterone concentration in peripheral plasma or milk in cattle herd management. In : Control of Reproduction in the cow : current topics in veterinary medicine" ECE Conference Galway sept 27-30 (1977). 1: 576-595 Ed by J.N. SREENAN.
- THIBIER M. et SAUMANDE J. (1975) . Oestradiol  $17\beta$  , progesterone and  $17\alpha$  hydroxyprogesterone concentration in jugular venous plasma in cows prior to and during oestrus. J. Steroïd. Biochem. 6: 1433-1437.
- THIBIER M. (1976). Le cycle sexuel des mammifères domestiques. Econ. Med. Anim. 17: 135-177.