

Diagnostic sérique de la gestation chez la vache avec la technique d'agglutination passive de particules de latex

par G. BOZZOLO, W. TERRY CARRILLO, P. RAYNAUD

Laboratoire de Zootechnie, ENSAT
145, avenue de Muret, 31076 Toulouse Cédex

Summary. *Serum diagnosis of pregnancy in the cow using a passive agglutination technique with latex beads.*

This paper describes a test for diagnosing pregnancy in the cow based on the detection of blastocyst antigens in the maternal blood circulation. Rabbit anti-bovine embryo serum was agglutinated with the sera of non-pregnant cows to obtain specific antibodies. These rabbit antibodies were then absorbed on latex beads which could then be used for the standard passive agglutination reaction.

This diagnostic technique was tested on 415 animals. The results on pregnant cows were successful in 78 p. 100 of the cases (confidence interval : 69-86 p. 100) and on non-pregnant cows 94 p. 100 of the time (confidence interval : 90-97 p. 100).

This test is independent of the status of the ovaries and of the pregnancy stage. Detection is reliable from day 26 after coitum.

Introduction.

La connaissance précoce et précise de la gestation chez les bovins est un élément déterminant de la conduite rationnelle du troupeau. Non seulement celle-ci permet d'intervenir sur la durée de l'espace inter-vêlages, mais encore elle donne la possibilité d'établir avec certitude les taux de fertilité, d'infécondité, d'infertilité, d'avortements précoces au sein d'un troupeau, et de recourir le cas échéant aux mesures alimentaires ou sanitaires adéquates.

La certitude de la non-gravidité est à même d'orienter la décision de l'éleveur soit pour une nouvelle insémination de l'animal dès le prochain œstrus, soit pour un traitement médical approprié, soit pour la réforme de la vache jugée économiquement non rentable.

Les moyens utilisables pour diagnostiquer la gestation des vaches reposent sur des méthodes d'observation : réapparition ou non des chaleurs, palper rectal (Lauderdale, 1974 ; Thibier et Terqui, 1978), détection par des mâles vasectomisés ou des femelles androgénisées (Signoret, 1975), etc... ou sur des méthodes expérimentales telles que le dosage radioimmunologique de la progestérone dans le sérum ou le lait (Rodbard et Lewald, 1970 ; Thibier, 1974).

Plusieurs inconvénients apparaissent lors de l'utilisation de cette dernière technique en pratique courante comme le signalent Thibier (1976) et Chupin et André (1977). Par ailleurs, le dosage radioimmunologique de la progestérone requiert un équipement de laboratoire important. La ponctualité des prélèvements nécessaire pour permettre le diagnostic différentiel reste peu compatible avec la conduite moderne des troupeaux, avare en main-d'œuvre et pratiquant une surveillance individuelle réduite. Enfin le risque d'erreur face à certains cas pathologiques comme la présence de corps jaunes kystiques n'est pas négligeable. Or ce sont précisément les animaux de cette catégorie qui posent des problèmes de reproduction et pour lesquels l'éleveur aura recours à ce type d'analyse.

Les méthodes directes, telles que la détection de HCG chez la femme (Moulias, 1977 ; Robert *et al.*, 1979) ou de PMSG chez la jument, permettraient de surmonter cet écueil. Cependant chez la vache le placenta ne produit pas de protéine sérique chorionique précoce à activité hormonale (Thibault, 1978 ; Sauer, 1979).

Toutefois la présence d'antigènes associés à la gestation dans la circulation maternelle a été signalée par plusieurs auteurs : c'est le cas de la Pregnancy Zone Protein (PZP) (Schoultz von et Stigbrand, 1973 ; Schoultz Von *et al.*, 1976) de l' α -foeto-protéine (AFP) (Smith *et al.*, 1979) de l'hormone lactogène placentaire (bLP) (Staples *et al.*, 1961 ; Buttle et Forsyth, 1976 ; Martal, 1978), de la progestérone blastocytaire (Gadsby *et al.*, 1976), de la protéine spécifique de la gestation (Laster, 1977) chez la vache. Dès lors, il apparaît possible de s'appuyer sur la détection d'antigènes blastocytaires pour poser un diagnostic de gestation. Staples *et al.* (1976), Cerini *et al.* (1976a, b), Lawson *et al.* (1976) ont mis à profit cette particularité en recourant aux méthodes d'immunofluorescence et d'hémagglutination directe à l'aide d'un immun-sérum antiembryon chez la brebis.

Plus récemment, Morton *et al.* (1979) retenant l'effet immunodépresseur de facteurs précoces contenus dans le sérum de femelles gravides, détectent la gestation chez la souris et la brebis par un test modifié d'inhibition de la formation de rosette.

Nous avons envisagé de produire un sérum antiembryon bovin rendu spécifique par adsorption différentielle contre une source antigénique provenant de vaches non gestantes. Le choix et la mise au point d'une technique de diagnostic de la gestation ont été orientés vers les procédés immuno-chimiques compte tenu de leur spécificité et de leur grande sensibilité (Terry Carrillo, 1979). Ce travail rapporte les résultats obtenus avec la méthode d'agglutination passive de particules de latex et rend compte de la mise à l'épreuve de ce diagnostic de gestation sur un échantillon de 415 animaux.

Matériel et méthodes.

1. — *Obtention d'un sérum antiembryonnaire.* — Un ensemble d'embryons bovins âgés d'un mois environ a servi de source antigénique pour immuniser 17 lapins âgés de 2 mois au début de l'expérimentation. La préparation est réalisée en broyant les embryons dans de l'azote liquide. La quantité de protéines embryonnaires employée par injection et par lapin est de 1 mg (Holborow et Johnson, 1967). L'émulsion injectable est préparée en associant à la solution antigénique un volume égal d'adjuvant complet de Freund (Calbiochem).

Le programme d'immunisation retenu est le suivant. Au cours de la première stimulation, la dose de préparation antigénique est administrée de façon fractionnée par voie sous-cutanée (plante des pattes plus quatre sites dans la région dorsale). La deuxième stimulation antigénique est exécutée de façon similaire 30 jours après la première. La troisième stimulation intervient 30 jours plus tard mais cette fois avec la solution antigénique seule (sans adjuvant). Huit jours après, un premier prélèvement sanguin permet de vérifier la richesse en anticorps du sérum de lapin ; si le taux d'anticorps est insuffisant, les animaux sont restimulés.

Les sérums sont analysés séparément afin d'éliminer les sujets peu réagissants. Le titre précipitant minimal retenu est la dilution 1/128 du sérum. Ultérieurement une seule détermination est réalisée sur l'ensemble des sérums recueillis.

Les lapins sont placés en diète hydrique et 12 h plus tard le sang est prélevé par ponction cardiaque (20 à 30 ml par animal). La séparation du sérum et du caillot intervient après incubation dans des tubes secs à parois siliconées, 2 h à la température du laboratoire, puis pendant 12 h à 5 °C. Le sérum prélevé doit être limpide.

2. — *Epuisement de l'antisérum en anticorps non spécifiques de la gestation.* — Ce sérum possédant des anticorps dirigés contre l'ensemble des constituants antigéniques embryonnaires ne peut prétendre à la spécificité. Nous avons réalisé une adsorption sélective avec une source antigénique provenant d'un ensemble de vaches non gestantes.

Parmi les différentes sources essayées : globules rouges lavés ou non, poudre de foie lyophilisée, plasma normal ou après lyophilisation, sérum filtré ou non, lyophilisé ou non, seul le sérum de vache vide, filtré, nous a donné satisfaction. Le rapport 1/1 des composants introduits a été déterminé en se référant à la zone d'équivalence de la courbe de précipitation. L'incubation du mélange par volume de 2 ml se fait pendant 1 h à 37 °C, puis durant 12 h à 4 °C. L'antisérum purifié est séparé du précipité formé par centrifugation (2 500 t.p. min pendant 5 min). Après contrôle de non-précipitation aux différentes dilutions (1 à 1/256) du sérum de vache non gestante, celui-ci est alors conditionné en doses de 0,5 ml puis stocké à — 25 °C.

3. — *Agglutination passive de particules de latex ; technique de diagnostic de gestation.* — Des différentes méthodes utilisées : précipitation en milieu liquide, hémagglutination directe, immunodiffusion double en gel, microimmunoélectrophorèse, agglutination passive de particules de latex (Terry Carrillo, 1979), seule la dernière a permis de déceler la présence d'antigènes fœtaux dans les sérums maternels de façon significative et spécifique.

Le protocole opératoire retenu est le suivant :

— La sensibilisation des particules de latex (polystyrène \varnothing : 0,79 μ) par fixation des anticorps du sérum de lapin à leur surface est obtenue en mélangeant 2 ml de sérum antiembryon épuisé et filtré à une suspension constituée de 0,1 ml de la suspension mère à 10 p. 100 de latex (Sigma Chemical Company) ajouté à 8,0 ml de tampon glycolle 1,0 M, 0,15 M NaCl, pH 8,2. Cette préparation après avoir été agitée énergiquement au cyclomixer doit être utilisée dans un bref délai à cause de l'agglutination spontanée que nous avons constatée après un délai de 12 h de conservation à la température de 5 °C.

— Les échantillons à analyser sont prélevés par ponction veineuse. Après formation du caillot le sérum est extrait et filtré (porosité \varnothing : 0,45 μ).

— La réaction consiste dans le mélange de 0,1 ml de la suspension de latex sensibilisé à 0,1 ml du sérum bovin à tester dans des tubes à hémolyse transparents de 1 ml. Après scellement de l'extrémité, les tubes sont agités, mis à incuber à l'étuve pendant 90 min à 56 °C puis à 5 °C durant 20 h.

— Les réactions de détermination sont réalisées en double exemplaire en présence du tube témoin contenant du latex non sensibilisé. En outre, un témoin de contrôle de coagulation spontanée éventuelle du latex est inséré dans chaque série d'analyse afin d'éprouver la qualité de la suspension de latex sensibilisé utilisée.

— Après incubation, les tubes sont centrifugés à 2 500 t.p. min pendant 5 min. La réaction est alors lue en appréciant d'une part le caractère plus ou moins limpide du liquide ambiant et d'autre part, la taille des agglutinats remis en suspension à l'aide d'une chiquenaude donnée sur le fond du tube. L'échelle des intensités retenues comporte 6 notations : —, \pm , +, ++, +++, +++++ (fig. 1) auxquelles nous avons fait correspondre la pondération respective suivante : 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; ceci afin d'établir la liaison entre l'intensité de la réaction et l'état de gestation.

— Les résultats consignés sont la moyenne des deux lectures lorsque celles-ci ne diffèrent pas de plus d'un gradient. Dans le cas contraire, les dosages sont refaits. Il en va de même lorsque le contrôle « latex sensibilisé seul » présente une réaction positive, l'ensemble de la série est alors recommencée avec une suspension plus fraîche. Les témoins latex non sensibilisés + sérum de vache à tester ont montré pour 16 animaux sur 415 une faible réaction (\pm , \pm ou \pm , —). Dans ce cas, le résultat final affiche la différence entre l'indication du test et son témoin.

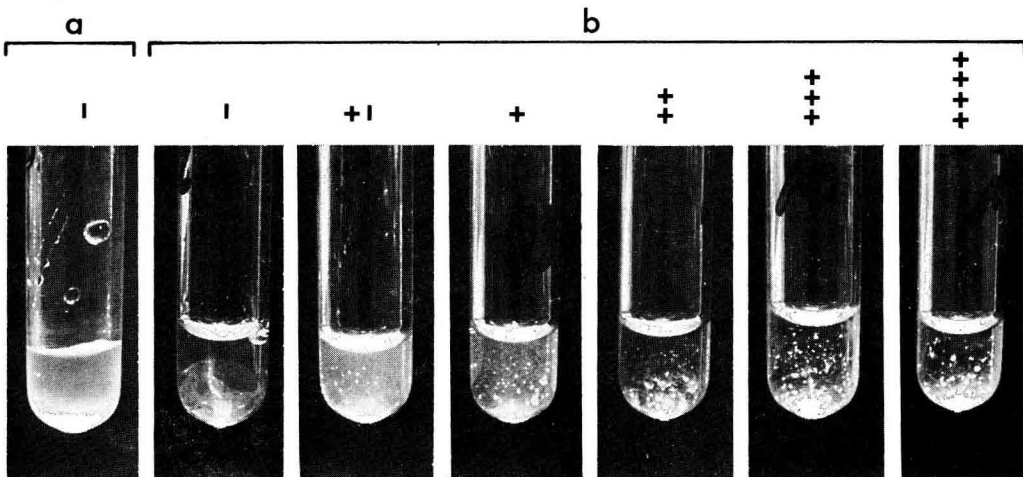


FIG. 1. — Gradients d'intensité de la réaction d'agglutination passive de particules de latex sensibilisé avec un sérum antiembryon.

- a) Tube témoin : l'incubation est réalisée avec du latex non sensibilisé et le sérum de vache à tester ;
 b) Les tubes sont incubés avec du latex sensibilisé et le sérum à analyser.

4. — *Animaux contrôlés.* — Les contrôles ont porté sur 415 animaux dont 25 mâles entiers ou castrés. Les échantillons furent collectés aux abattoirs compte tenu du nombre important d'animaux disponibles et surtout de la possibilité de vérifier immédiatement le stade de reproduction des vaches au cours de l'éviscération.

La prise de sang a été effectuée avant l'abattage à l'aide de tubes sous vide sili-conés (venoject Terumo).

Au moment de l'éviscération les tractus génitaux femelles furent systématiquement prélevés et disséqués. Les observations ont porté sur la présence ou l'absence de fœtus, sur les caractéristiques des ovaires et de l'utérus :

— Les fœtus extraits de la cavité utérine furent mesurés, les particularités de leur développement repérées, afin de permettre ultérieurement l'estimation de leur âge d'après les normes communiquées par Chang (1952), Roberts (1971), Arthur (1975), Hafez et Jainudeen (1975), Melton *et al.* (1951).

— Les annotations concernant l'appareil génital ont porté sur les points suivants : appareil génital adulte ou non, contenu de l'utérus (lochies, proximité du part, mucus d'œstrus, pus, fœtus morts ou macérés), aspect des ovaires (follicules et/ou corps jaunes, corps hémorragiques, kyste lutéal, kyste folliculaire, absence de structure visible sur l'ovaire).

Résultats.

Intensité de la réaction. Précision et signification.

1. — *Intensité de la réaction.*

a) *Vaches gestantes* (tabl. 1). — Les stades du début de la gestation sont regroupés en 0-25 jours, 26-45 jours afin de saisir les stades de préimplantation et de post-implantation proximale. Les autres périodes de gestation sont centrées sur le mois correspondant ± 15 jours. La classe 9 correspond aux 15 derniers jours de gestation. Les résultats consignés dans ce tableau ne tiennent compte que des vaches gravides confirmées et réagissantes au test.

TABLEAU 1

Variation de l'intensité de la réaction selon le stade de gestation

Stades de gestation	Jours		Mois							Ensemble	
	0-25	26-45	2	3	4	5	6	7	8		9
n	3	11	5	13	8	14	11	13	10	3	91
\bar{m}	1,33	1,59	1,9	1,75	2,31	1,98	2,45	2,71	2,35	2,75	2,13
$t \frac{S}{\sqrt{n}}$		0,43	0,49	0,31	0,32	0,28	0,40	0,34			0,14

n : effectif ; \bar{m} : moyenne de l'intensité des réactions observées ; $t \frac{S}{\sqrt{n}}$: intervalle de confiance de la moyenne à P < 0,05.

La moyenne de l'intensité de la réaction observée dans les diverses classes laisse apparaître des niveaux de réaction différents. L'analyse de la variance (tabl. 2) montre une influence significative ($P < 0,01$) du temps de gestation sur l'expression de ces moyennes.

TABLEAU 2
Tableau d'analyse de la variance

Origine de la variabilité	SCE	ddl	S ²	F
Totale	44,542 6	90	0,494 9	
Stades de gestation	15,007 0	9	1,667 4	4,57 **
Résiduelle	29,535 6	81	0,364 6	

** Significative à $P < 0,01$.

La comparaison des moyennes deux à deux permet de constituer un regroupement formé par les classes d'âge de faible intensité et ceci de façon significative. Afin de déterminer un seuil minimal d'intensité de la réaction à partir duquel une vache pourrait être déclarée gestante, nous avons retenu ce groupe de faible valeur d'intensité incluant les classes : 0-25 jours, 26-45 jours, 2, 3 et 5 mois. Les caractéristiques de ce groupe sont les suivantes :

$$n = 46 ; \bar{m} : 1,77 ; t \frac{s}{\sqrt{n}} = 0,20 .$$

b) *Vaches non gestantes.* — Seules les vaches réagissantes ont été retenues. Toutefois les valeurs fortement positives (+++) révélées par 6 animaux sur 195 possédant des corps jaunes (CJ) n'ont pas été considérées pour cette détermination. En effet, l'observation du tractus génital dans les conditions de notre contrôle permet difficilement de détecter les stades de postfécondation très récents, ce qui pourrait être une explication de ces cas particuliers.

Pour indiquer un seuil maximal d'intensité de la réaction en dessous duquel la non-gestation pourrait être retenue, nous avons calculé les caractéristiques de ce groupe de vaches vides réagissantes :

$$n = 78 ; \bar{m} = 0,47 ; t \frac{s}{\sqrt{n}} = 0,07 .$$

2. — Signification de la réaction.

En confrontant les résultats obtenus tant sur le groupe des vaches gestantes à faible réactivité que sur celui des vaches non gestantes nous adoptons pour seuils extrêmes en référence à l'état de gravidité des animaux les valeurs suivantes :

— seuil minimal de positivité au test : $S_{mi} \geq 1,5$;

— seuil maximal de négativité au test : $S_{max} \leq 0,5$ soit lorsque les deux lectures donnent les couples (—, —), (—, ±) ou (±, ±).

Les valeurs d'intensité comprises entre 1,5 et 0,5 signalent des sujets « douteux » pour lesquels il conviendrait de réaliser un nouveau prélèvement, c'est-à-dire, lorsque les couples de lecture fournissent les cas de figure : (\pm , +) ou (+, +).

Validité du diagnostic de gestation par agglutination passive de particules de latex.

1. — Résultats obtenus sur vaches gestantes (tabl. 3).

TABLEAU 3
Validité de la réaction chez les vaches gestantes

Effectifs	Jours		Mois								Ensemble
	0-25	26-45	2	3	4	5	6	7	8	9	
Total	5	12	6	14	9	15	12	13	11	5	102
Positives	2	8	4	9	8	12	11	13	10	3	80
Douteuses	1	2	—	2	—	2	—	—	—	—	7
Négatives	2	2	2	3	1	1	1	—	1	2	15
p. 100 réussite ..	40,0	66,7	66,7	64,3	88,9	80,0	91,7	100	90,9	60,0	78,4

Il ressort que les classes de durée de gestation extrêmes : 0-25 jours, 9 mois, présentent des pourcentages faibles de réussite (40 et 60 p. 100 respectivement). Toutefois il est difficile de conclure à ce niveau eu égard aux faibles effectifs correspondants. En définitive, l'intérêt de ce test peut se mesurer au travers des pourcentages suivants : réussite : 78 (IC ⁽¹⁾ : 69-86) ; échec : 15 (IC : 9-24) ; « douteux » : 7 (IC : 3-14).

2. — Résultats obtenus sur vaches non gestantes (tabl. 4).

TABLEAU 4
Validité de la réaction chez les vaches non gestantes

Effectifs	Oestrus	Post-partum	Contenu utérin anormal	CH	CJ	KL	KF	Sans structure	Ensemble
Total	17	30	7	9	195	9	6	13	286
Négatives	17	28	7	8	182	9	6	12	269
Douteuses	—	2	—	—	7	—	—	1	10
Positives	—	—	—	1	6	—	—	—	7
p. 100 réussite ..	100	93,3	100	88,9	93,3	100	100	92,3	94,0

CH : corps hémorragique ; CJ : corps jaune ; KL : kyste lutéal ; KF : kyste folliculaire.

(¹) IC = intervalle de confiance.

Ces résultats font ressortir les pourcentages suivants : réussite : 94 (IC : 90-97) ; échec : 2 (IC : 1-5) ; « douteux » : 3 (IC : 2-7).

En outre nous remarquons que tous les animaux affectés d'un corps jaune kystique ont donné des réactions négatives.

3. — Résultats obtenus sur mâles entiers et castrés (tabl. 5).

TABLEAU 5
Validité de la réaction contrôlée sur mâles entiers et castrés

Effectifs	Mâles	Mâles castrés	Ensemble
Total	9	16	25
Négatifs	9	15	24
Douteux	—	1	1
Positifs	—	—	—
p. 100 réussite...	100	93,7	96,0

Sur ces petits effectifs, nous n'observons pas de réaction positive, ce qui peut laisser à penser que les antigènes détectés ne se rencontrent que chez les animaux femelles.

Discussion et conclusion.

Les résultats acquis démontrent la présence d'antigènes spécifiques de la gestation dans la circulation maternelle, confirmant les travaux de Morton *et al.* (1974), Cerini *et al.* (1976a, b), Staples *et al.* (1976), Morton *et al.* (1979). Cette particularité permet d'envisager l'utilisation de leur détection pour diagnostiquer la gestation.

Le test que nous avons employé repose sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec un sérum de lapin antiembryon bovin purifié, en présence d'antigènes spécifiques de la gestation. Ces derniers sont sans doute en proportion infime dans le sérum maternel compte tenu de la sensibilité de cette méthode immunologique et des échecs enregistrés avec les autres méthodes moins sensibles : précipitation en milieu liquide, agglutination directe, précipitation double en gel (Pillot et Peltier, 1973).

Le pourcentage de réussite chez les vaches gestantes confirmées atteint 78 p. 100 chez les vaches vides il est de 95 p. 100. Les taux d'erreur enregistrés sont de 15 p. 100 chez les vaches gestantes et 2 p. 100 chez les vaches vides. Les non-déterminations qualifiées de « douteuses » et pour lesquelles il convient de réaliser un nouveau prélèvement sanguin figurent respectivement pour 7 et 3 p. 100. La détection des vaches non gestantes est donc plus fiable que celle des vaches gravides.

Au total sur l'ensemble de 415 animaux contrôlés, les pourcentages globaux sont les suivants :

Taux de réussite	: 90 (IC, 89-93).
Taux d'échec	: 5 (IC, 3-8).
Taux de non-déterminé	: 4 (IC, 2-6).

Sur le plan de la précocité, ce test est intéressant au-delà de 26 jours de gestation. Un jugement définitif pour les stades plus précoces reste à établir.

Les conditions de mise en œuvre de cette méthode montrent des avantages par rapport à la méthode actuelle du dosage radioimmunologique de la progestérone. Avec notre technique, le diagnostic est réalisable à n'importe quel stade de la gestation ou de la cyclicité ovarienne alors que le second procédé impose la contrainte du prélèvement après un temps post-insémination (21 jours) équivalent à une possible chute du taux de progestérone circulante (cas de la vache cyclique), ce qui constitue une limite pour son utilisation dans une routine de travail propre à une conduite du troupeau en groupe.

En outre le test au latex décèle la présence ou l'absence de l'embryon et non le fonctionnement d'un corps jaune qui pourrait être cyclique, gestatif ou pathologique comme c'est le cas avec le dosage de la progestérone.

Finalement l'exactitude du diagnostic reposant sur le dosage de la progestérone fournit un taux de réussite pour la détection de la non-gestation de 95 p. 100 (Thibier *et al.*, 1977 ; Thibier, 1977, 1978), ce qui est comparable aux résultats que nous obtenons avec le test au latex. Par contre, dans le cas de la détection des vaches gestantes, nos éléments de comparaison sont insuffisants compte tenu des faibles effectifs contrôlés au stade du début de gestation.

Les résultats communiqués par Morton *et al.* (1979) avec le test d'inhibition de la rosette suggèrent un dépistage de la fécondation réussie 24 h après l'accouplement chez la brebis. Ce test présente également l'intérêt d'être utilisable quel que soit le stade de gestation et indépendamment de la situation ovarienne des animaux. Cependant son efficacité n'a pas été vérifiée sur un nombre suffisant d'animaux (7).

Le taux d'indécision dans la technique au latex ne constitue pas un handicap majeur puisqu'il n'affecte que 4 p. 100 de l'effectif contrôlé. Par contre le principal inconvénient de la méthode réside dans la nécessité d'avoir recours au prélèvement sanguin. Il est évident que pour permettre la vulgarisation d'une technique il est nécessaire d'atténuer la difficulté du prélèvement des échantillons. Il serait donc souhaitable d'essayer cette technique sur des liquides biologiques plus facilement accessibles comme le lait pour les vaches multipares.

Dans ce travail, la nature et le rôle des antigènes détectés n'ont pas été abordés.

Il semble possible de perfectionner la méthode, sans doute en isolant les antigènes incriminés dans la réaction, ce qui permettrait la production d'un antiserum plus spécifique et plus riche en anticorps.

Reçu en juin 1980.

Accepté en août 1980.

Références

- ARTHUR G. H., 1975. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 4th Ed. Formerly Wright's Veterinary obstetrics. Baillière Tindall, London, 616 pp.
- BUTTLE H. L., FORSYTH I. A., 1976. Placental lactogen in the cow. *J. Endocr.*, **68**, 141-146.
- CERINI M., CERINI J. C., FINDLAY J. K., LAWSON R. A. S., 1976a. Preliminary characterization of pregnancy specific antigen(s) in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **46**, 534.
- CERINI M., FINDLAY J. K., LAWSON R. A. S., 1976b. Pregnancy-specific antigens in the sheep : application to the diagnosis of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, **46**, 65-69.

- CHANG M. C., 1952. Development of bovine blastocyst with a note on implantation. *Anat. Rec.*, **113**, 143-162.
- CHUPIN D., ANDRÉ D., 1977. Les diagnostics de gestation chez la vache. *Product. lait. moderne*, n° 46, 25-29.
- GADSBY J. E., BURTON R. D., HEAP R. B., PERRY J. S., 1976. Steroid metabolism and synthesis in early embryonic tissue of pig, sheep and cow. *J. Endocr.*, **71**, 45P-46P.
- HAFEZ E. S. E., JAINUDEEN M. R., 1975. Gestation, prenatal physiology and parturition. In HAFEZ E. S. E., *Reproduction in farm animals*, ch. 8, 166-202. 3rd Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- HOLBOROW E. J., JOHNSON G. D., 1967. In WEIR D. M., *Handbook of experimental immunology*. ch. 16, 571-596. Blackwell Sci. Publ. Oxford and Edimburg.
- LASTER D. B., 1977. A pregnancy specific protein in the bovine uterus. *Biol. Reprod.*, **16**, 682-690.
- LAUDERDALE J. W., 1974. Estrus detection and synchronisation of dairy cattle in large herds. *J. Dairy Sci.*, **57**, 354.
- LAWSON R. A. S., CERINI M., FINDLAY J. K., 1976. An immunological test for pregnancy in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **46**, 532-533.
- MARTAL J., 1978. L'hormone lactogène placentaire chez la vache, 55-61. In : *Physiopathologie de l'utérus chez la vache*. Journ. Inform. Soc. Franc. de Buéatrie, Lyon.
- MELTON A. A., BERRY R. O., BUTTLER O. D., 1951. The interval between the time of ovulation and attachment of the bovine embryo. *J. anim. Sci.*, **10**, 993-1005.
- MORTON H., HEGH V., CLUNIE G. J. A., 1974. Immunosuppression detected in pregnant mice rosette inhibition test. *Nature*, **249**, 459-460.
- MORTON H., NANCARROW C. D., SCARAMUZZI R. J., EVISON B. M., CLUNIE G. J. A., 1979. Detection fo early pregnancy in sheep by the rosette inhibition test. *J. Reprod. Fert.*, **56**, 75-80.
- MOULIAS R., 1977. Réactions immunologiques de grossesse, 355-365. In BERTHAUX P., MOULIAS R. C. E. S. *d'Immunologie*. Edit. Médicales et Universitaires, Paris, 4^e éd.
- PILLOT J., PELTIER A. P., 1973. *Techniques en immunologie. Les examens de laboratoire*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 148 pp.
- ROBERT H. G., PALMER R., BOURY-HEYLER C., COHEN J., 1979. *Précis de gynécologie* 2^e éd. Masson, Paris, New York, Barcelone, Milan, 885 pp.
- ROBERTS S. J., 1971. *Veterinary obstetrics and genital diseases* (Therigenology). Edwards Brother Inc. Ann Arb., Michigan.
- RODBARD D., LEWALD J. E., 1970. Computer analysis of radioligan assay and radioimmunoassay data. *Acta endocr., Copenh.*, Suppl. **147**, 79-103.
- SAUER M. J., 1979. Hormone involvement in the establishment of pregnancy (Review). *J. Reprod. Fert.*, **56**, 725-743.
- SCHOULTZ VON B., STIGBRAND T., 1973. Purification of the « pregnancy zone » protein. *Acta obstet. gynec. scand.*, **52**, 51-57.
- SCHOULTZ VON B., STIGRAND T., MARTINSSON K., HOLMGREN N., 1976. Demonstration of analogues to the human pregnancy zone protein in animals. *Acta endocr.*, **81**, 379-384.
- SHEMESH M., AYALON N., LINDNER H. R., 1973. Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe. *J. anim. Sci.*, **36**, 726-729.
- SIGNORET J. P., 1975. Nouvelle méthode de détection de l'œstrus chez les bovins. *Ann. Zootech.*, **24**, 125-127.
- SMITH K. M., LAI P. C. W., ROBERTSON H. A., CHURCH R. B., LORSCHIEDER F. L., 1979. Distribution of alpha 1-fetoprotein in fetal plasma, allantoic fluid, amniotic fluid and maternal plasma of cows. *J. Reprod. Fert.*, **57**, 235-238.
- STAPLES R. E., Mc ENTEE K., HANSEL W., 1961. Luteal function as related to pituitary and ovarian cytology and embryo development in the bovine. *J. Dairy Sci.*, **44**, 2049-2057.
- STAPLES L. D., LAWSON R. A. S., CERINI M., SHEERS M., FINDLAY J. K., 1976. Production and characterization of antisera to pregnancy specific antigens in the sheep, cow and pig. *Therigenology*, **6**, 627.
- TERRY CARRILLO W., 1979. *Diagnostic de gestation chez la vache. Méthodes immunologiques*. Th. Doct. 3^e cycle, INP Toulouse, 162 pp.

- THIBAUT C., 1978. L'implantation : sa programmation, 1-9. In du MESNIL du BUISSON F., PSYCHOYOS A., THOMAS K., *L'implantation de l'œuf*, Masson, Paris, New York, Barcelone, Milan.
- THIBIER M., 1974. Le diagnostic précoce de gestation chez la vache, 201-219. In : *Conduite du troupeau et reproduction*. Journ. ITEB-UNCEIA, ITEB ed., Paris.
- THIBIER M., 1976. Le diagnostic de gestation chez la femelle de l'espèce bovine *Point vét.*, **V**, n° 21, 61-68.
- THIBIER M., 1977. Etudes hormonales. Diagnostic précoce de non-gestation. *Elev. Insém.*, **161**, 34-38.
- THIBIER M., 1978. Etudes hormonales. Diagnostic précoce de gestation. *Elev. Insém.*, **166**, 5-12.
- THIBIER M., TERQUI M., 1978. Les diagnostics de gestation et de non-gestation chez les mammifères domestiques de la ferme, 127-146. In du MESNIL du BUISSON F., PSYCHOYOS A., THOMAS K., *L'implantation de l'œuf*. Masson Paris, New York, Barcelone, Milan.
- THIBIER M., PETIT M., HUMBLLOT P., 1978. Use of progesterone concentrations in peripheral plasma or milk in cattle herd management, 567-595. In SREENAN J. M., *Control of reproduction in the cow* CEC. Martinus Nijhoff, The Hague.
-