

Les protéines associées à la gestation chez les ruminants: biomarqueurs au service du diagnostic

BECKERS J.-F.

Université de Liège – Faculté de Médecine Vétérinaire – Service de Physiologie de la Reproduction
Bd de Colonster 20, B41 – 4000 Sart Tilman – Belgique

Ce travail a été réalisé avec le soutien de l'IRSIA et du FNRS

LIMINAIRE

Le Placenta, organe temporaire, intermédiaire entre les générations est indispensable au développement d'un fœtus dans l'utérus d'une mère, pas nécessairement de sa mère. En effet, dès 1890, Heape de Cambridge communiquait à la *Royal Society* qu'il avait transplanté avec succès des œufs fécondés d'une lapine dans une autre lapine déjà en gestation; le transfert fut effectué le 27 avril et les naissances se produisirent le 29 mai. L'objectif poursuivi par Heape était de vérifier si les caractères génétiques des embryons transplantés se trouvaient influencés par le milieu de la mère de remplacement; la réponse fut négative (Heape, 1891)... la publication ne relate cependant rien de particulier concernant le placenta.

La production des hormones qui assurent la régulation des activités de la gestation est l'une des plus intéressantes des fonctions spécialisées du placenta. Quiconque étudie le placenta pour la première fois peut s'étonner que ce soit cet organe qui assure cette fonction et non la mère ni le fœtus. Et pourtant, avant même que le placenta se forme au niveau anatomique, des cellules trophoblastiques particulières synthétisent et sécrètent en abondance des molécules aux fonctions paracrine ou endocrine.

Chez les humains, la première hormone produite en quantité notable est la gonadotrophine chorionique ou hCG. Tout au début de la différenciation du trophoblaste, cette molécule enrobe la surface des cellules trophoblastiques; agissant sans doute comme une couche de protection immunitaire, elle empêche le rejet du blastocyste et facilite son implantation. Chez les ruminants, l'implantation se produit plus tardivement et de façon beaucoup plus superficielle: la placentation est dite épithélio (chez la vache) ou syndesmo (chez la brebis et la chèvre) chorale.

HISTORIQUE DE NOTRE DEMARCHE EXPERIMENTALE

En 1978, au moment où nous avons entrepris nos recherches sur l'endocrinologie placentaire chez la vache, les connaissances relatives à la fonction endocrine du placenta étaient limitées au lactogène placentaire (bPL) (Buttle & Forsyth 1976; Bolander & Fellows 1976). Le sujet de notre thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur universitaire a porté sur la purification, la caractérisation et la mise au point du dosage de cette hormone. De façon surpre-

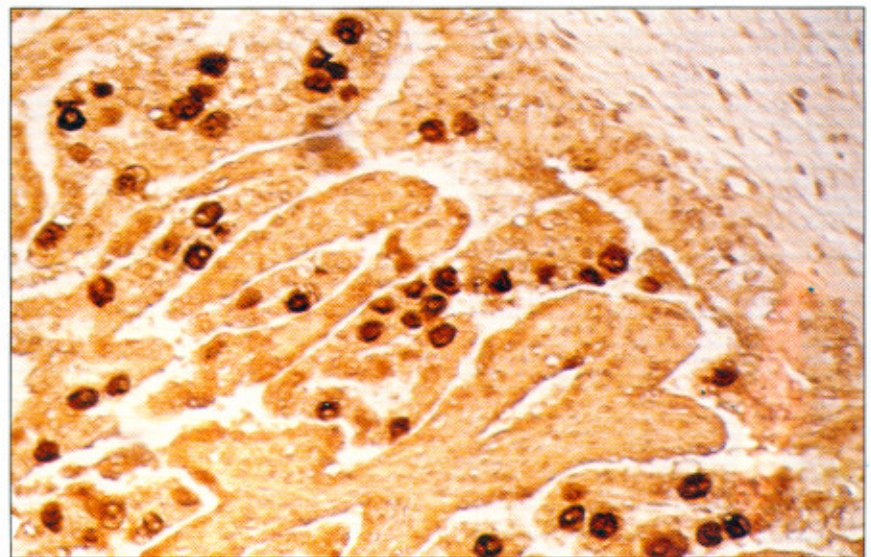


Figure 1
Interface fœto-maternelle chez la vache.
D'après Verstegen *et al.*, 1982.

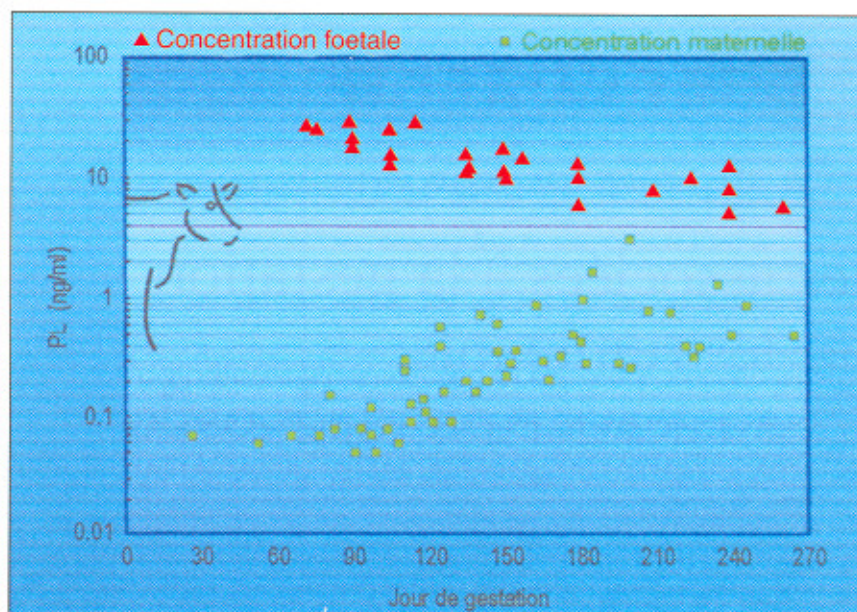


Figure 2
 Profils plasmatiques de l'hormone lactogène placentaire chez la mère et le fœtus.
 D'après Beckers *et al.*, 1982.

nante, le lactogène placentaire bovin (bPL) est libéré en faible concentration dans la circulation maternelle et parmi les conclusions de notre travail, l'une mérite d'être rappelée ici. Chez les humains, la concentration de l'hPL dans le sang maternel s'élève rapidement dès le début de la grossesse tandis que chez le fœtus, la concentration est toujours faible, bien inférieure à celle que l'on retrouve chez la mère et ce quel que soit le stade de développement. Chez les ovins, la concentration s'élève régulièrement chez la mère tandis qu'elle décroît régulièrement chez le fœtus; aux environs du 100^e jour de la gestation, les deux concentrations se croisent (Chan *et al.* 1978). Chez les bovins, la concentration fœtale diminue régulièrement jusqu'à la naissance mais elle reste toujours supérieure à celle de la mère (figure 2; Beckers *et al.* 1982).

Quelques années plus tard, au moment où nous rédigeons la discussion du manuscrit intitulé «Trinucleate cells and ultrastructural localisation of bovine placental lactogen» dans lequel nous décrivions la migration des cellules binucléées, puis leur franchissement de la bordure «fœtomaternelle» et leur fusion avec des cellules épithéliales de l'endomètre (figure 3), nous avons relevé que la majorité des cellules ne délivraient leur contenu qu'après la fin de la migration. De plus, nous ne

trouvons pas de formes d'exocytose aussi longtemps que les cellules étaient localisées du côté fœtal ou qu'elles étaient en migration (Wooding et Beckers, 1987). Ceci ne correspondait pas aux caractéristiques des concentrations mesurées concernant le lactogène placentaire chez le fœtus et chez la mère et ceci suggérait indirectement que les cellules binucléées étaient capables de synthétiser et de délivrer dans le compartiment maternel d'autres constituants *encore inconnus à l'époque...* Le caractère PAS positif des cellules binucléées et trinucléées et la suspicion de l'existence d'une hormone chorionique gonadotrope équiva-

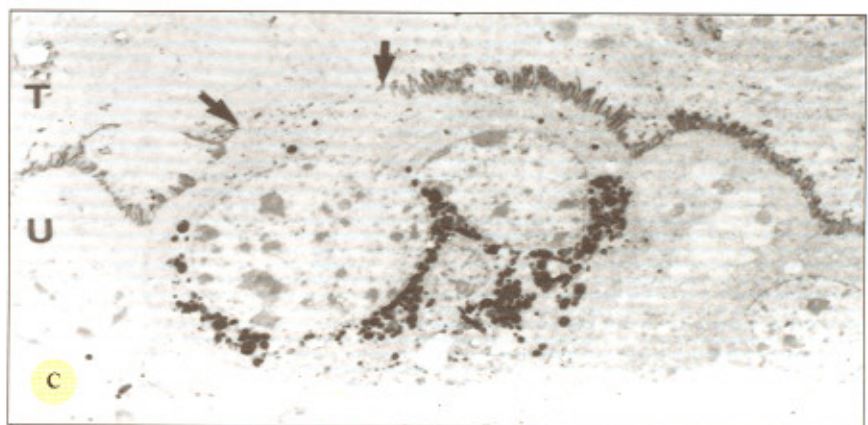
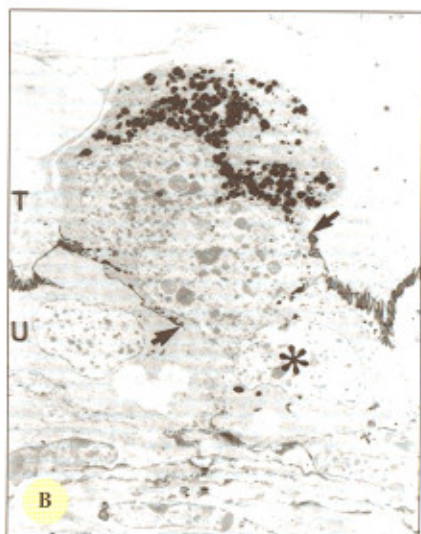


Figure 3
 Migration d'une cellule binucléée dans le placenta bovin.
 T = trophoblaste; U = Utérus
 D'après Wooding et Beckers, 1987.

- A. Une cellule binucléée, chargée de granulations a migré jusqu'à la jonction microvillose.
 B. Une cellule binucléée juste après fusion avec une cellule épithéliale (*) de l'endomètre maternel.
 C. Une cellule trinucleée – ou géante – insérée dans l'épithélium utérin.

lente à l'hCG ou à la PMSG nous a fait orienter notre recherche sur la purification des glycoprotéines associées à la gestation et secrétées dans la circulation sanguine maternelle. Les premières étapes de ces investigations ont été particulièrement difficiles car, malencontreusement et très vite, il était apparu que les protéines bovines ne présentaient pas de réaction croisée avec les protéines humaines isolées par Tatarinov & Masyukewich (1970), classifiées et repertoriées l'année suivante par Bohn (1971), communication personnelle (1983). En conséquence, les premières étapes de notre recherche ont consisté en la réalisation d'extraction et de fractionnement puis de purification par chromatographie d'affinité et enfin par une production d'antisérums. Les purifications par affinité consistaient essentiellement à débarrasser les solutions de l'albumine bovine, de l'hémoglobine adulte et fœtale, du bPL et des immunoglobulines qu'elles contenaient (par suite de la grande quantité de sang qui contamine habituellement les extraits placentaires). Cette démarche, associée à l'immunodiffusion radiale et à l'immunoélectrophorèse, a permis de mettre en évidence deux protéines: la première qui s'est révélée dépourvue de toute activité hormonale (ni FSH, ni LH, ni PRL, ni GH, ni TSH, ni ACTH...) et dont la concentration plasmatique augmentait dans le sang de la mère en fonction de l'avancement de la gestation (Beckers *et al.* 1988^a). La seconde protéine inhibait la liaison de la lutropine (LH) et de la

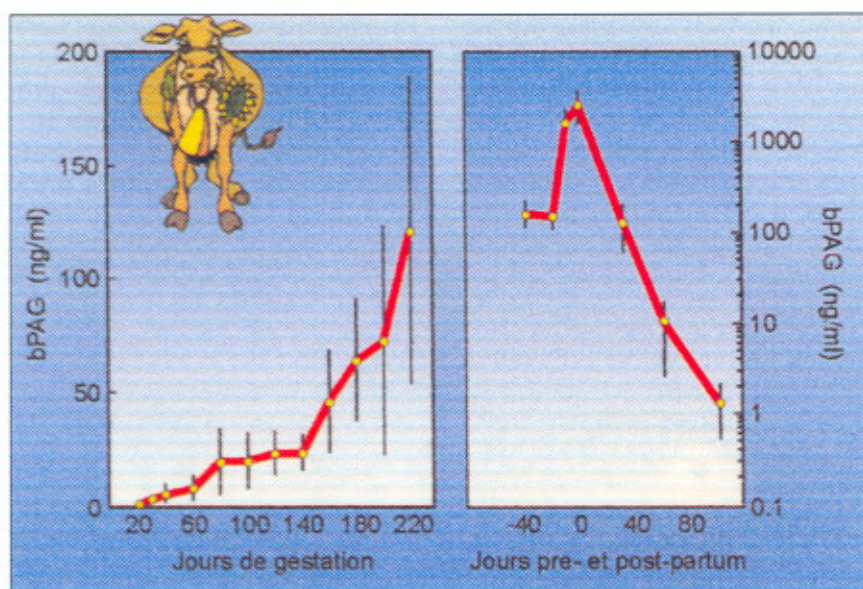


Figure 4
Profil de concentration de la PAG chez la vache gestante.
D'après Zoli *et al.*, 1992.

follitropine (FSH) aux récepteurs membranaires spécifiques; nous avons considéré cette molécule comme Gonadotropine Chorionique Bovine (bCG) et bien qu'elle ne présentât aucune réaction croisée avec la PMSG ni avec l'hCG, nous l'avons considérée comme un équivalent de ces hormones chez la vache. Nous étions également étonnés que la liaison de cette bCG aux antisérums anti-lutropine bovine et porcine fût faible et inconstante (Beckers *et al.* 1988^b). Mais revenons à la première protéine qui a l'époque fut appelée PSP (Pregnancy Specific Protein) puis PAG pour Protéine Associée à la Gestation ou *Pregnancy Associated Glycoprotein* car nous avons décelé sa présence dans les extraits de testi-

cules et dans les extraits ovariens des ruminants. Ceci rendait la protéine non strictement spécifique de la gestation. La PAG a été purifiée jusqu'à l'homogénéité et caractérisée par le Docteur A. Zoli (Zoli *et al.*, 1991). Rapidement, nous avons pu développer un dosage radioimmunologique sensible qui permettait de détecter et de quantifier la protéine dans le sang maternel dès le début de la gestation. Le profil de concentration est repris dans la figure n° 4. Dès cette époque, une collaboration a été développée avec le Professeur RM Roberts – Université du Missouri-Columbia aux USA – et cette collaboration a permis d'isoler les cDNA codant pour les PAGs bovine et ovine, de les séquencer et de montrer l'apparte-

		NH ₂ -Terminal							COOH-Terminal						
		30	32						213	215					219
Pepsine	(humaine)	Val	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Ile	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Ser
Cathepsine E	(humaine)	Ile	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Ile	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Ser
Cathepsine D	(humaine)	Val	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Ile	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Ser
Chymosine	(bovine)	Leu	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Ile	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Ser
Rénine	(humaine)	Val	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Leu	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Ser
bPAG	(bovine)	72	74					78	253	255					259
		Val	Phe	Asp	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Ser
oPAG	(ovine)	72	74					78	255	257					261
		Val	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Leu	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser

Tableau 1

Comparaison de la séquence des acides aminés de l'oPAG à celles de la bPAG et de certaines protéinases aspartiques au niveau des régions qui encadrent les résidus d'acides aspartiques considérés comme essentiels pour l'activité catalytique de la pepsine. Les NH₂-terminal et COOH-terminal font référence respectivement aux lobes situés du côté de ces extrémités. (Xie *et al.*, 1991)

nance des PAG à la famille des protéases aspartiques. Dans cette famille les PAG coexistent avec les pepsinogènes humain, porcine et simien, avec les cathepsines D & E, les chymosines et la rénine, etc. (tableau 1).

Les antisérums générés contre la seconde protéine (appelée bCG) et la disponibilité de fractions de protéines semi-purifiées ont permis le clonage d'autres cDNA à partir du placenta. Leur séquençage a révélé

leur appartenance également à la famille des protéases aspartiques. Ce qui nous a permis de désigner cette protéine PAGII (Protéine Associée à la Gestation de la classe II) (Tableau II).

Protéine	N-Terminal						C-Terminal						Enzyme active ?
bPAG 2	F	D	T	G	S	A	V	D	T	G	T	S	Inconnu
bPAG 1	F	D	T	A	S	S	V	D	T	G	T	S	Probablement non
oPAG 1	F	D	T	G	S	S	V	G	T	G	T	S	Probablement non
Pepsine (simienne)	F	D	T	G	S	S	V	D	T	G	T	S	Oui
Pepsine (humaine)	F	D	T	G	S	S	V	D	T	G	T	S	Oui
Chymosine (bovine)	F	D	T	G	S	S	V	D	T	G	T	S	Oui
Rénine (humaine)	F	D	T	G	S	S	V	D	T	G	A	S	Oui
Rénine (souris)	F	D	T	G	S	A	V	D	T	G	A	S	Oui
Cathepsine D (humaine)	F	D	T	G	S	S	V	D	T	G	T	S	Oui
Cathepsine E (humaine)	F	D	T	G	S	S	V	D	T	G	T	S	Oui
Consensus	F	D	T	G	S	S	V	D	T	G	T	S	Oui
Pepsine du Rhizopus	F	D	T	G	S	S	L	D	T	G	T	T	Oui
Pepsine du Penicillium	F	D	T	G	S	A	A	D	T	G	I	L	Oui

Tableau 2

Pour différentes protéases aspartiques, comparaison des séquences en acides aminés constitutives des domaines du site catalytique. Les carrés roses montrent les substitutions d'acides aminés qui n'empêchent pas l'activité catalytique, le carré bleu indique une substitution qui probablement inactive l'enzyme. (Xie *et al.*, 1994)

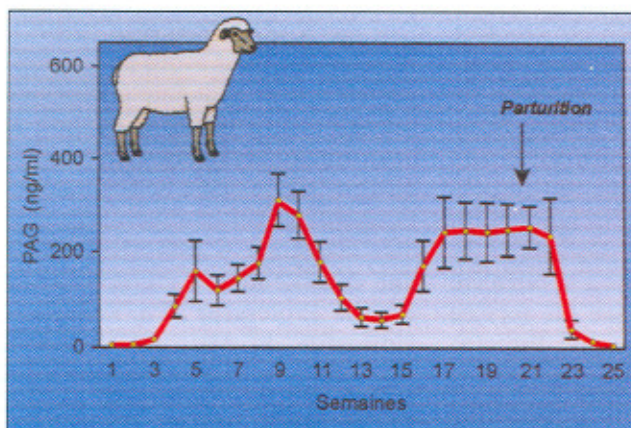


Figure 5

Profil de concentration de la PAG chez la brebis gestante. D'après Ranilla *et al.*, 1994.

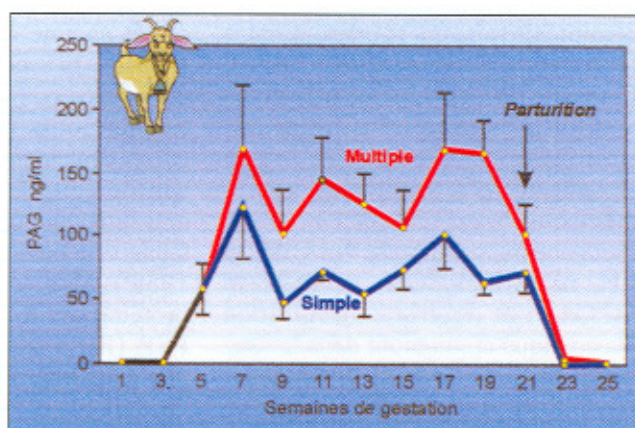


Figure 6

Profil de concentration de la PAG chez la chèvre gestante. D'après Sousa *et al.*, 1998.

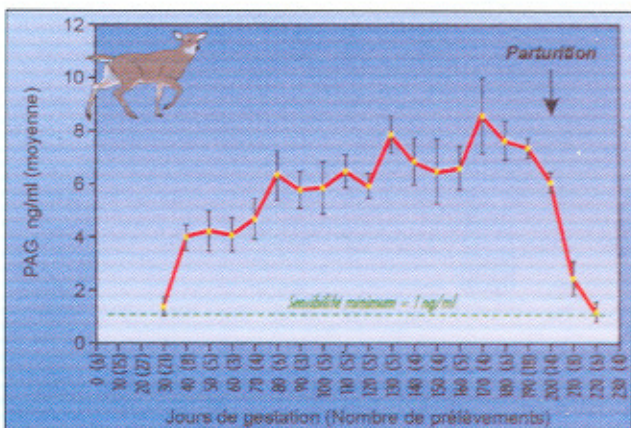


Figure 7

Profil de concentration de la PAG chez le cerf de Virginie durant la gestation. D'après Osborn *et al.*, 1996.

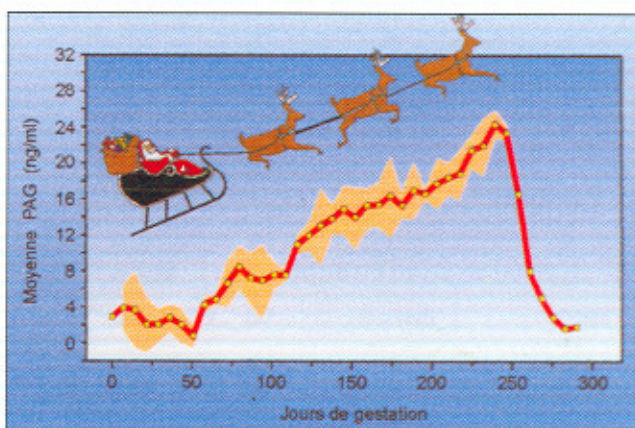


Figure 8

Profil de concentration de la PAG chez le renne durant la gestation. D'après Dahl *et al.* (en préparation).

Cette caractérisation de la protéine clarifiait la question de l'identité de l'hormone gonadotrope placentaire chez la vache et levait les incertitudes qui continuaient à régner sur son existence (Xie *et al.*, 1994). Le 29 octobre 1994, nous avons eu l'honneur de communiquer nos résultats devant l'Académie Royale de Belgique en séance publique. Notre exposé s'intitulait: «Molécules de la famille des protéinases aspartiques dans le placenta des ruminants: hormones ou protéines?», il était signé J.F. Beckers, R.M. Roberts, A.P. Zoli, F. Ectors et J. Derivaux (membre titulaire). Ainsi, la protéine isolée sur la base de son activité lutéotrope appartenait également au groupe des protéases aspartiques; elle était fortement apparentée à la PAGI avec laquelle elle présentait environ 58% d'homologie. Et nous enchaînions notre présentation: ainsi la protéine – que nous avons appelée gonadotropine chorionique bovine au début de nos recherches – n'était autre qu'un nouveau membre du groupe des protéases aspartiques, de surcroît fortement apparenté à la PAG. En raison de cette similitude structurale avec les protéases aspartiques et de dissemblances importantes avec les gonadotropines hypophysaires (séquence, structure sous-unitaire), le terme d'hormone chorionique gonadotrope bovine n'a pas été maintenu dans la publication même si une activité LH est liée à cette molécule. Et la protéine douée d'une activité gonadotrope a été dénommée «pregnancy associated glycoprotein II».

Aujourd'hui, quelques années plus tard, nous restons dans l'incertitude: faut-il considérer la protéine à activité de type LH comme la gonadotropine chorionique bovine (bCG) ou faut-il au contraire la classifier en fonction de son appartenance au groupe des protéases aspartiques et la considérer comme une simple «pregnancy associated glycoprotein II» (PAGII)? Dans ce choix de terminologie, la littérature ne peut guère nous aider bien que certaines protéases à sérines soient capables de se lier au récepteur d'hCG et même de l'activer (Willey et Leidenberger, 1987). Dans la même publication, ces auteurs ont montré des similitudes de structure entre certaines protéases à sérines tel le chymotrypsinogène et l'hCG humaine.

Assez rapidement, nos investigations ne se sont plus limitées aux seuls bovins; nous avons également porté notre intérêt sur les ovins. Chez la brebis, le dosage de la protéine associée à la gestation permet également d'établir un diagnostic précoce de gravidité (dès le 25^e jour après la fécondation). Dans cette espèce cependant, le profil apparaît différent de celui des bovins; l'élévation en

phase terminale de la gestation est beaucoup moins prononcée (Fig. 5; Ranilla *et al.*, 1994).

Il est de même apparu que la protéine existe également chez d'autres ruminants: chez les caprins (Fig. 6; Folch *et al.* 1993 et Sousa *et al.* 1998) et chez les ruminants sauvages: cerfs de Virginie, renne. (Fig. 7; Osborn *et al.* 1996; Fig. 8; Dahl en préparation).

PAG62_goat	1	RDSXVTFIVPLRNMRDIVVVGXITIGTF	27	S	I
SBU_3_69_sheep	1	QGSXVTILPLRNMKDIFYVVGXITIDTF	27	81	70 %
PAG1_sheep	54	RASNLTIHPLRNIMDMLYVGNITIGTF	80	81	67 %
PAG1_bovine	54	RGNLTTHTPLRNLIKDLVYMGNTIGTF	80	81	63 %
PAG2_bovine	51	NDSKITIHPLRNYLDTAYVGNISIGTF	77	70	63 %
SBU_3_62_sheep	1	--SXLTIPLLRNMXDIFYRGGXITIGGP	28	70	63 %
PEPF_rabbit	43	QDPDVSFEPLRNYLDLAYIGIISIGTF	69	70	52 %
PAG2_pig	59	HVQKFSYQPLRNYLDMVYVGNISIGTF	85	67	52 %
PAG_horse	57	ADSGVAFEPMRNYLDIAYMGIISVGTG	83	67	52 %
PAG2_sheep	75	SDPKLSTHTPLRNALDMAYVGNVTIGTF	101	67	48 %
PAG1_pig	59	CSPKISCLRLWNYLDMVYVGNITIGTF	85	59	48 %

PAG59_goat	1	RGSXLTTPLLRNIMDMLHMGXITIGTF	27	S	I
PAG1_bovine	54	RGNLTTHTPLRNLIKDLVYMGNTIGTF	80	85	74 %
PAG1_sheep	54	RASNLTIHPLRNIMDMLYVGNITIGTF	80	85	74 %
SBU_3_69_sheep	1	QGSXVTILPLRNMKDIFYVVGXITIDTF	27	78	55 %
PAG2_sheep	75	SDPKLSTHTPLRNALDMAYVGNVTIGTF	101	70	52 %
PAG2_pig	59	HVQKFSYQPLRNYLDMVYVGNISIGTF	85	70	44 %
PEPF_rabbit	43	QDPDVSFEPLRNYLDLAYIGIISIGTF	69	70	41 %
SBU_3_62_sheep	1	--SXLTIPLLRNMXDIFYRGGXITIGGP	28	67	48 %
PAG2_bovine	51	NDSKITIHPLRNYLDTAYVGNISIGTF	77	67	44 %
PAG1_pig	59	CSPKISCLRLWNYLDMVYVGNITIGTF	85	67	41 %
PAG_horse	57	ADSGVAFEPMRNYLDIAYMGIISVGTG	83	67	55 %

PAG55_goat	1	ISSPVSXLTIHPLRNIMDMLYVXITIT	27	S	I
PAG1_sheep	51	ISFRASNLTIHPLRNIMDMLYVGNITI	77	85	81 %
PAG1_bovine	51	ISFRGNLTTHTPLRNLIKDLVYMGNTIT	77	74	63 %
PAG2_bovine	48	LSKNDSKITIHPLRNYLDTAYVGNISI	74	70	55 %
PAG2_pig	56	NSSHVQKFSYQPLRNYLDMVYVGNISI	82	67	48 %
PAG2_sheep	72	DSASDPKLSHTPLRNALDMAYVGNVTI	98	63	52 %
SBU_3_69_sheep	1	--QGSXVTILPLRNMKDIFYVVGXITI	24	63	52 %
SBU_3_62_sheep	1	--SXLTIPLLRNMXDIFYRGGXITI	22	59	48 %
PAG1_pig	56	GSLSKISCLRLWNYLDMVYVGNITI	82	56	41 %
PEPF_rabbit	40	SGQQDPDVSFEPLRNYLDLAYIGIISI	66	52	33 %
PAG_horse	54	HKHADSGVAFEPMRNYLDIAYMGIISV	80	52	30 %

Tableau 3
Séquences N terminales des PAGs caprines: comparaison aux PAGs identifiées dans les autres espèces animales. Garbayo *et al.*, 1998.

Récemment, trois nouvelles formes de la protéine associée à la gestation ont été isolées à partir de placentas de chèvres. Ces formes se distinguent de la PAG isolée en 1988 par leurs poids moléculaires de 55, 59 et 62 kDa et leur séquence en acides aminés. Le tableau III permet de comparer leurs séquences N terminales à celles d'autres membres de la famille des protéases aspartiques identifiés dans le placenta. Différents antisérums ont été produits contre ces PAGs caprines; ils sont utilisables dans les dosages radio-immunologiques et améliorent la précocité du diagnostic de gestation posé par analyse du sérum (Gonzalez *et al.* 1999, in press).

PAGs ET DIAGNOSTIC DE GESTATION

Les glycoprotéines associées à la gestation sont synthétisées dès le stade de l'élongation du blastocyte éclos (jour 10-12). Cependant, au début, les quantités ne suffisent pas à provoquer dans le sang maternel des concentrations détectables par nos méthodes actuelles. C'est ainsi qu'après la fécondation, il faut attendre:

- 21, 22 jours chez la chèvre,
- 25 jours chez la brebis,
- 30 jours chez la vache et chez la biche.

Ensuite, chez les différentes espèces étudiées à ce jour, la concentration

augmente jusqu'aux 50^e, 60^e, 70^e jours; chez la chèvre et chez la brebis, elle se maintient *grosso modo* jusqu'à la parturition tandis que chez la vache, elle augmente sans cesse pour atteindre des valeurs très élevées au moment du part.

Vous référant aux courbes de référence et en fonction de la date des dernières chaleurs, vous pouvez établir un diagnostic prédictif de gestation à partir des concentrations relevées dans le dosage. Dorénavant, en Belgique, le dosage des PAGs chez les ruminants est proposé aux docteurs en médecine vétérinaire via les laboratoires provinciaux et le laboratoire d'hormonologie du CER à Marloie. Il

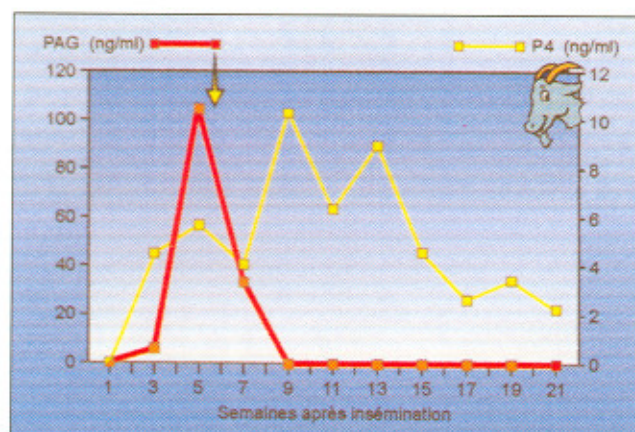


Figure 12

Profil de concentration de la PAG chez une chèvre dont la gestation a été interrompue suite à une mortalité embryonnaire.

D'après Sousa *et al.*, 1998.

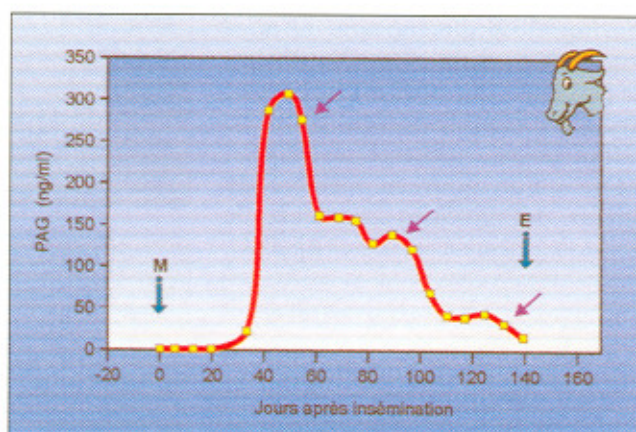


Figure 15

Profil de concentration de la PAG chez une chèvre qui au terme de 137 jours, a expulsé 3 fœtus morts. Le degré de décomposition des fœtus et les chutes de concentration de la PAG nous autorisent à situer la détresse fœto-placentaire à 3 moments indiqués par les flèches. (M = Mating (ou saillie); E = Expulsion).

D'après Zarrouk *et al.*, 1999.

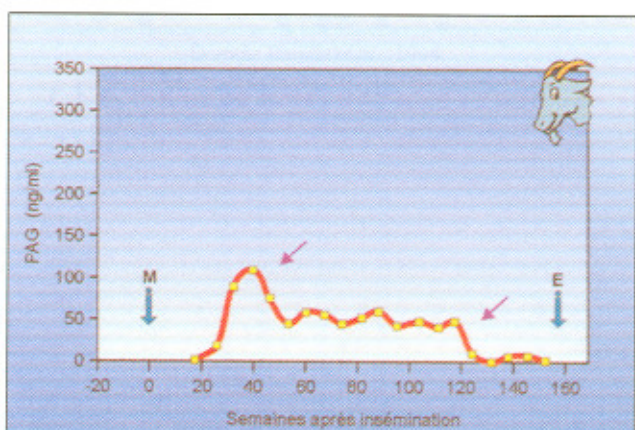


Figure 14

Profil de concentration de la PAG chez une chèvre qui, au terme de 158 jours, expulse 2 fœtus morts. Le degré de décomposition des fœtus et les chutes de concentration de la PAG nous autorisent à situer la détresse fœto-placentaire aux périodes indiquées par les flèches et en tout cas bien avant l'expulsion.

D'après Zarrouk *et al.*, 1999.

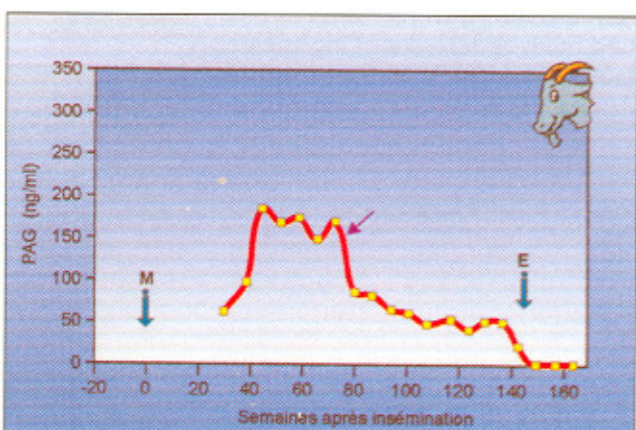


Figure 15

Profil de concentration de la PAG chez une chèvre qui, au terme de 144 jours, expulse un fœtus mort et met au monde un fœtus vivant. L'époque de la détresse placentaire est indiquée par la flèche.

D'après Zarrouk *et al.*, 1999.

se réalise sur sérum (ou sur plasma); un prélèvement réalisé exactement de la même manière que pour les sérodiagnostics habituels (brucellose, leucose, IBR, BVD, VISNA-MEDI, CAEV, ...) convient parfaitement. Lors de bilans sanitaires portant sur l'ensemble du troupeau, il est facile d'indiquer au laboratoire les numéros des femelles gestantes, ou présumées gestantes, à contrôler.

Il est vraisemblable que dans les prochaines années, ce type de dosage

sera utilisé de plus en plus fréquemment pour suivre la gestation chez les ruminants.

EVOLUTION DU PROFIL DES PAGs LORS DE MORTALITE EMBRYONNAIRE, MORTALITE FŒTALE OU AVORTEMENT...

Les protéines associées à la gestation sont synthétisées et sécrétées dans les couches superficielles du tropho-

blaste étroitement associées ou fusionnées avec le tissu maternel. Par conséquent, les protéines associées à la gestation ou en tout cas une bonne partie d'entre elles entrent dans la circulation sanguine maternelle. Dans le sang maternel, ces glycoprotéines montrent une grande stabilité; leur demi-vie s'exprime en dizaine d'heures voire en jours. Grâce à une collaboration née en 1996 entre l'Université d'Oslo et la nôtre, nous avons pu comparer l'intérêt du dosage de différents paramètres

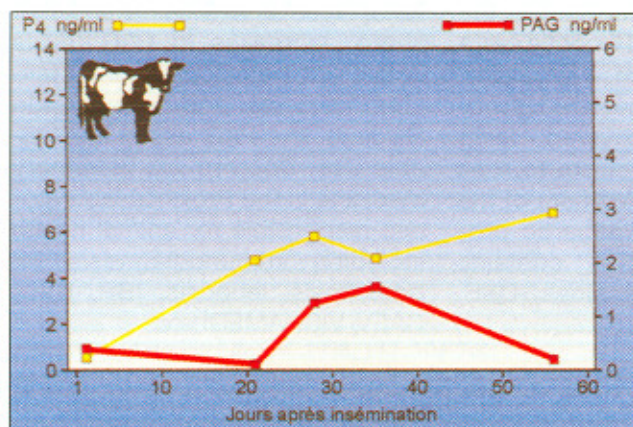


Figure 16a

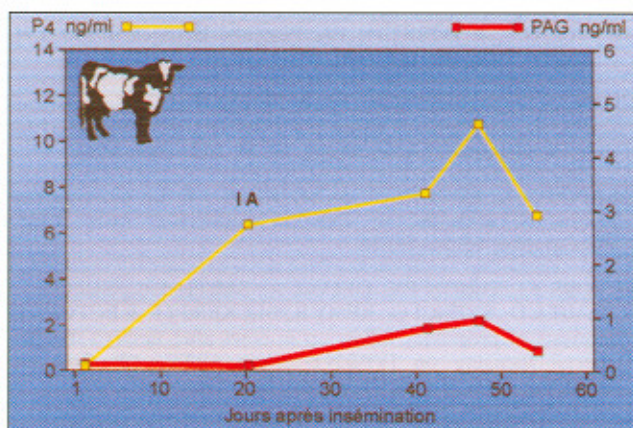


Figure 16b

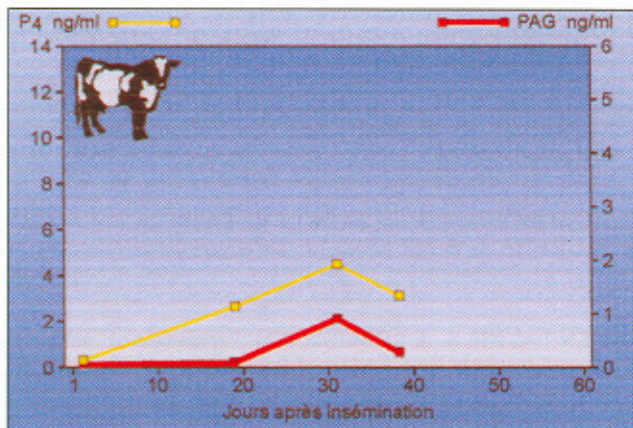


Figure 16c

Figure 16
Profils de concentration de la PAG et de la progestérone chez trois vaches dont la gestation a été interrompue précocement suite à une mortalité embryonnaire.
D'après Szenci *et al.*, 1998.

Figure 16a
Vache 3129.

Figure 16b
Vache 3369.

IA = seconde insémination responsable de la mort embryonnaire.

Figure 16c
Vache 3570.

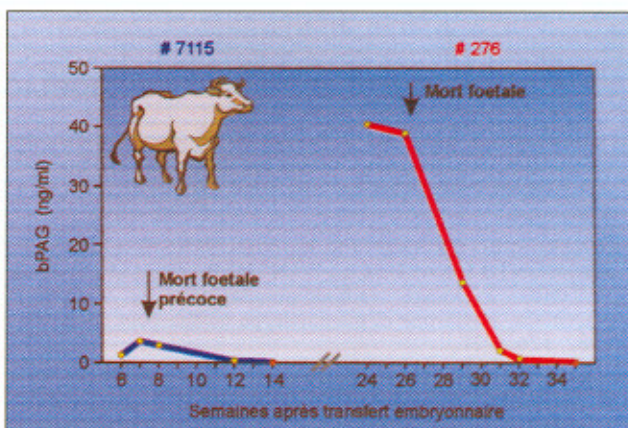


Figure 17

PAG: biomarqueur de la mortalité fœtale précoce ou tardive.
D'après Ectors *et al.*, 1996.

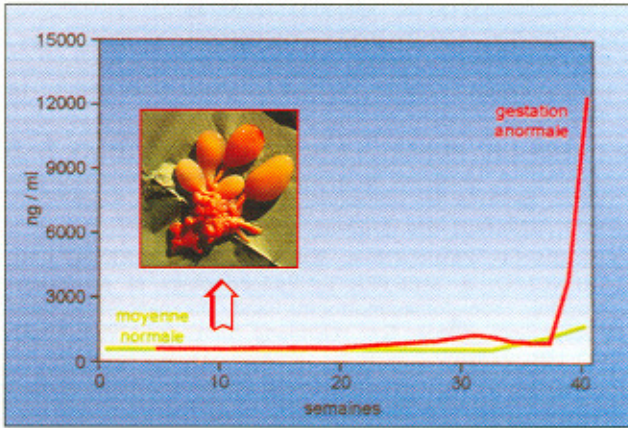


Figure 18

PAG: biomarqueur de gestation anormale avec mole hydatiforme.
D'après Ectors *et al.*, 1996.

dans l'étude de la pathogénie de la détresse fœto-placentaire précédant ou accompagnant les échecs de gestation chez la chèvre. Parmi les nombreux paramètres spécifiques mesurés dans le sang de la mère: progestérone, œstrone sulfate, 15 cetodihydro, PGF2a et non spécifiques: protéines totales, albumine, alpha 1 globulines, alpha 2 globulines, bêta-globulines, gamma-globulines, gamma-glutamyl-transferase et glucose, la protéine associée à la gestation est celle qui apporte l'information la plus riche (Fig. 12, 13, 14 & 15). (Zarrouk *et al.*, 1999)

Dans l'espèce bovine, la PAG constitue également un excellent biomarqueur de la fonction trophoblastique (Fig. 16 a, b, c et 17). Sont en cours actuellement en Pologne des investigations chez les ovins (collaboration Gajewski) et au Brésil sur les Zébus (Université de Santa Maria, collaboration Sousa).

Summary

«Inactive members of the aspartic proteinase family, the ruminants pregnancy-associated glycoproteins for serological diagnosis

During the last decade, investigations were carried out in the Faculty of Veterinary Medicine in order to characterize proteins or glycoproteins synthesized in the ruminant placenta. Recently, as a result of this research, a large family of pregnancy-associated glycoproteins was discovered. Using molecular biology techniques, they were found to be members of the superfamily of the aspartic proteinases which also contains pepsinogen, cathepsins D&E, chymosin, renin etc.

Synthesized in the mono or binucleate cells of the trophoblast, the pregnancy-associated glycoproteins (PAG) do not have proteinase activity. It is likely they are synthesized together with molecules involved in the tissue remodeling of the placenta. Their release in large quantities into the maternal blood circulation results in measurable plasma concentrations.

Thanks to international collaborative studies, we have shown that PAG levels are a good indicator of fœtoplacental well being and that sharp decreases in PAG levels occur just before pregnancy failures in cows and in goats. In Belgium, the PAG assay is available for Doctors in Veterinary Medicine in the Province laboratories responsible for animal health including immunodiagnosis for brucellosis, leucosis, IBR, BVD, CAEV, VISNAMEDI etc.

BIBLIOGRAPHIE

- BECKERS J.F. & ECTORS F. Dosage de l'hormone placentaire somatotrope et mammotrope bovine par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**: 311-319.
- BECKERS J.F., DE COSTER R., WOUTERS-BALLMAN P., FROMONT-LIÉNARD Ch., VAN DER ZWALMEN P. & ECTORS F. Dosage radioimmunologique de l'hormone placentaire somatotrope et mammotrope bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1982, **126**: 9-21.
- BECKERS J.F., FROMONT-LIÉNARD Ch., VAN DER ZWALMEN P., WOUTERS-BALLMAN P. & ECTORS F. Isolement d'une hormone placentaire bovine présentant une activité analogue à la prolactine et à l'hormone de croissance. *Ann. Méd. Vét.*, 1980, **124**: 585-601.
- BECKERS J.F., WOUTERS-BALLMAN P. & ECTORS F. Isolation and radioimmunoassay of a bovine pregnancy specific protein. *Theriogenology*, janvier 1988, **29**(1): 219 (Abs).
- BECKERS J.F., DEWULF M., VERSTEGEN J., WOUTERS-BALLMAN P. & ECTORS F. Isolation of a bovine chorionic gonadotrophin (bCG). *Theriogenology*, janvier 1988, **29**(1): 218 (Abs).
- BECKERS J.F., ROBERTS R.M., ZOLI A.P., ECTORS F. & DERIAUX J. Molécules de la famille des protéinases aspartiques dans le placenta des ruminants: hormones ou protéines? *Bull. Mém. Acad. Roy. Méd. Belgique*, 1994, **149**: 355-367.
- BECKERS J.F., ZARROUK A., BATALHA E.S., GARBAYO J.M., SZENCI O. & MESTER L. Endocrinology of pregnancy: chorionic somatomammotropins and pregnancy-associated glycoproteins: review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1998, **46**(2): 175-189.
- BOLANDER F.F., Jr & FELLOWS R.E. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**: 2703-2708.
- BUTTLE H.L. & FELLOWS R.E. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**: 2703-2708.
- BUTTLE H.L. & FORSYTH I.A. Placental lactogen in the cow. *J. Endocr.*, 1976, **68**: 141-146.
- CHAN J.S.D., ROBERTSON H.A. & FRIESEN H.G. Maternal and fetal concentrations of ovine placental lactogen measured by radioimmunoassay. *Endocrinology*, 1978, **102**: 1606-1613.
- DERIVAUX J., ECTORS F. & BECKERS J.F. Le placenta des ruminants: structure et fonction endocrine, mars 1988, monographie, édition IRSIA.
- ECTORS F.J., DRION P.V., DELVAL A., SMITH L.C., SULON J., ZAAIJER D., SZENCI O., REMY B., BECKERS J.F. & ECTORS F. Interests of pregnancy follow-up in cows after embryo transfer special focusing on IVP&NT origin. AETE, 12^e Colloque Scientifique, 13-14 septembre 1996, Lyon France, 95-102.
- FOLCH J., BENITEZ W., ALABART J.L. & BECKERS J.F. Determinacion de la concentracion plasmatica de PAG (pregnancy associated glycoprotein) en cabras blanca celtiberica y su utilizacion como diagnostico de gestacion. Edition Asociacion Interprofesional para el Desarrollo Agrario, V^e Journées pour la production animale, 1993, 364-366.
- GARBAYO J.M., REMY B., ALABART J.L., FOLCH J., WATTIEZ R., FALMAGNE P. & BECKERS J.F. Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family from the goat placenta. *Biol. Reprod.*, 1998, **58**: 109-115.
- GONZÁLEZ F., SULON J., BATISTA M., CABRERA F., CALERO P., GRACIA A. & BECKERS J.F. Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology*, in press.
- GREEN J.A., XIE S. & ROBERTS R.M. Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Reviews of Reproduction*, 1998, **3**: 62-69.
- HEAPE W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova in a uterine foster-mother. *Proc. R. Soc.*, 1891, **48**: 457-458.

- OSBORN D.A., BECKERS J.F., SULON J., GASSETT J.W., WHITE L., MURPHY B.P., MILLER K.V. & MARCHINTON R.L. Use of two pregnancy-associated glycoprotein RIA's for pregnancy diagnosis in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management*, 1996, **60**(2): 388-393.
- PATEL O.V., SULON J., BECKERS J.F., TAKAHASHI T., HIRAKO M., SASAKI N. & DOMEKI I. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *European Journal of Endocrinology*, 1997, **137**: 425-428.
- RANILLA M.J., SULON J., CARRO M.D., MANTECÓN A.R. & BECKERS J.F. Plasmatic profiles of pregnancy associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in churra and merino sheep. *Theriogenology*, 1994, **42**: 537-545.
- SKINNER J.G., GRAY D., GEBBIE F.E., BECKERS J.F. & SULON J. Field evaluation of pregnancy diagnosis using bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG). *Cattle Practice*, BCVA, 1996, vol. 4, part 3: 281-284.
- SOUSA N.M., GARBAYO J.M., FIGUEIREDO J.R., SULON J. & BECKERS J.F. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations during gestation and postpartum in moxoto and caninde natives goats of northeast of Brazil. *Small Ruminants Research*, 1998, **1759**: 1-11.
- SZAFRANSKA B., XIE S., GREEN J. & ROBERTS R.M. Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophoblast. *Biology of Reproduction*, 1995, **53**: 21-28.
- SENJI O., TAVERNE M.A.M., BECKERS J.F., SULON J., VARGA J., BÖRZSÖNYI L., HANZEN Ch. & SCHEKK Gy. Evaluation of false ultrasonographic pregnancy diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine pregnancy associated glycoprotein 1 (bPAG1). *Veterinary Record*, 1998, **142**: 304-306.
- VERSTEGEN J., FELLMANN, D. & BECKERS J.F. Immunodetection of bovine chorionic somatomammotrophin (bCS). *Acta Endocrinologica*, 1985, **109**: 403-410.
- WILLEY K.P., LEINDENBERGER F. Functionally distinct agonist and receptor-binding regions in human chorionic gonadotropin. Development of a tertiary structure model. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**(33): 19716-29.
- WOODING F.B.P. & BECKERS J.F. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell Tissue Res.*, 1987, **247**: 667-673.
- XIE S., LOW B.G., NAGEL R.J., KRAMER K.K., ANTHONY R.V., ZOLI A.P., BECKERS J.F. & ROBERTS R.M. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**: 10247-10251.
- XIE S., LOW B.G., NAGEL R.J., BECKERS J.F. & ROBERTS R.M. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoblast. *Biology of Reproduction*, 1994, **51**: 1145-1153.
- ZARROUKA., REMY B., SULON, DRION P.V., BESBULEUX H. & BECKERS J.F. Endocrinologie de la Gestation chez les Ruminants: les protéines placentaires. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 1998, **142**: 171-184.
- ZARROUK A., ENGELAND I., SULON J. & BECKERS J.F. Determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in goats (*Capra hircus*) with unsuccessful pregnancies: a retrospective study. *Theriogenology*, 1999, vol. **51** (7): 1321-1331.
- ZOLI A.P., GUILBAULT L.A., DELAHAUT P., BENITEZ ORTIZ W. & BECKERS J.F. Radioimmunoassay of a Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in serum: Its Application for Pregnancy Diagnosis. *Biology of Reproduction*, 1992, **46**: 83-92.