

Isolement d'une hormone placentaire bovine présentant une activité analogue à la prolactine et à l'hormone de croissance (*) (**)

J.F. BECKERS, Ch. FROMONT-LIENARD, P. VAN DER ZWALMEN,
P. WOUTERS-BALLMAN et F. ECTORS

*Chaire d'Obstétrique et des Troubles de la Reproduction
Rue des Vétérinaires 45, B - 1070 Bruxelles*

RESUME

L'application de différents procédés de chromatographie a permis d'isoler une hormone à activité somatotrope et mammatrope à partir d'extraits cotylédonnaires fœtaux de bovins. Pour identifier cette hormone au cours des différentes étapes de la purification, nous avons dosé son activité prolactinique et somatotrophique en utilisant la technique des radio-récepteurs. L'hormone purifiée présente une activité prolactinique comparable à celle du standard PRL-NIH-B4 et une activité somatotrope égale à trois fois celle du standard GH-NIH-B18.

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, les conditions économiques imposent à l'éle-

vage des normes de production très élevées. Ces dernières ne peuvent être atteintes qu'au prix d'un contrôle très strict de la fertilité du troupeau. Maîtrise du

(*) Ces recherches ont été subsidiées par l'I.R.S.I.A., rue de Crayer 6, B - 1050 Bruxelles.

(**) Cette hormone est déjà connue sous le nom de « Bovine Placental Lactogen (B.P.L.) » ou « Bovine Chorionic Somatomammotropin (B.C.S.) ». Nous préférons l'appellation « Hormone Placentaire Somatotrope et Mammatrope (H.P.S.M.) qui tient compte de la dualité de l'activité hormonale.

cycle, repérage des chaleurs, examen périodique des organes génitaux, diagnostic précoce de la gestation sont autant de pratiques qui doivent entrer dans la gestion quotidienne de l'exploitation. Le diagnostic précoce de la gestation est posé soit par le dosage de la progestérone dans le sang ou le lait soit par le fouiller rectal.

La première méthode est basée sur la détermination du taux de la progestérone du 21^e au 23^e jour après la fécondation. En effet, si l'animal est gestant, le corps jaune cyclique se transforme en corps jaune gestatif et le taux de progestérone reste élevé dans le sang et dans le lait. Si au contraire, l'animal n'est pas gestant, le corps jaune cyclique subit la lutéolyse et le taux de progestérone rejoint son niveau de base. Il faut évidemment toujours effectuer la prise de sang ou de lait au moment où l'animal supposé gestant devrait normalement revenir en œstrus soit l'espace d'un cycle après l'insémination ou la saillie.

Parmi les avantages de cette technique, il faut citer :

- la précocité, car le diagnostic peut être posé 22 jours après la fécondation
- un pourcentage d'exactitude assez élevé : 70 à 80 % pour les résultats positifs, et 99 % pour les résultats négatifs
- la facilité de réalisation.

Le fouiller rectal permet de poser le diagnostic de gestation à partir du 45^e jour chez la génisse, et dès le 60^e jour chez la vache, et il offre en outre la possibilité d'apprécier le moment de la gestation. Le pourcentage d'erreur de ce

diagnostic est très faible, mais l'inconvénient majeur de cette technique réside dans l'obligation d'immobiliser les animaux, surtout lorsqu'il s'agit de troupeaux maintenus en liberté.

La solution idéale serait de trouver un moyen de diagnostiquer la gestation chez la vache sans devoir tenir compte du moment de la saillie et exigeant un minimum de manipulation des animaux. C'est pourquoi, nous avons développé un programme de recherches visant à identifier dans le sang une protéine spécifique de la gestation. En effet, il est bien établi qu'une fois la fécondation réalisée, l'œuf se divise activement et très tôt il sort de la membrane pellucide. Dès ce moment, le trophoblaste se développe rapidement pour donner naissance au placenta. Ce dernier joue un rôle très important dans le développement ultérieur de la gestation. Il sert d'organe de fixation et de nutrition du fœtus, il intervient en outre comme glande endocrine. A ce titre, il sécrète des hormones stéroïdiennes et polypeptidiques. Parmi ces dernières, il serait très intéressant d'isoler chez la vache, l'hormone qui constitue le signal embryonnaire. En effet, pour que la gestation puisse se poursuivre il faut qu'au 17^e-18^e jour après la fécondation, l'embryon signale sa présence au corps jaune de façon à empêcher la lutéolyse. La mise en évidence de ce signal permettrait d'établir un diagnostic très précoce de la gestation. Rappelons toutefois qu'actuellement ce domaine reste peu exploré chez la vache.

Plus tard au cours de la gestation, le placenta produit une hormone à la fois somatotrope et mammatrope qui comme son nom l'indique possède deux tropismes essentiels : elle exerce son activité sur les fonctions de croissance et de lactation.

Elle a été isolée pour la première fois par Bolander et Fellows (1976) ensuite par Roy et Coll. (1977) et enfin par Hayden et Forsyth (1979). Dans un premier temps, nous avons dirigé nos recherches sur l'isolement de cette protéine.

MATERIEL ET METHODES

1. Dosages permettant de suivre l'activité hormonale durant les différentes étapes de la purification

Pour repérer l'hormone native dans les différents extraits et les différentes fractions obtenues en cours d'isolement, nous avons retenu une technique de dosage par compétition entre l'hormone marquée et non marquée (froide) pour la liaison à un type donné de récepteurs membranaires. Tenant compte de la double activité de l'hormone recherchée, nous avons utilisé simultanément deux dosages différents, celui de la prolactine : PRL-RRA et celui de l'hormone de croissance : GH-RRA. Ceux-ci ont été réalisés selon les techniques décrites par Shiu et Coll. (1973) et par Tshushima et Friesen (1973) auxquelles nous avons apporté quelques modifications.

En résumé, les opérations sont réalisées de la manière suivante :

a) Préparation des récepteurs membranaires

Les glandes mammaires et le foie sont prélevés sur des lapines en fin de gestation ou quelques jours après la parturition. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée de 2 mg de Bromocryptine (Parlodel Sandoz*) 36, 24 et 12 heures avant le prélèvement (Djiane et coll. 1977). Directement après l'euthanasie, les glandes mammaires et le foie sont disséqués, divisés en fragments de 10 g. et stockés à -20°C . Pour la préparation des récepteurs propre-

ment dits, les opérations sont réalisées en maintenant la température aux environs de 0°C . Les tissus sont dégelés et homogénéisés pendant 6 fois dix secondes au moyen d'un broyeur mécanique de type Ultra-Turrax à la vitesse de 20.000 tours/minute dans une solution Tris HCl 0,025M ; MgCl_2 0,01 M ; pH 7,6 sucrose 0,3 M et dans un rapport poids/volume de 1/5. La solution est centrifugée à 15.000 g pendant 20 minutes puis le surnageant est repris et centrifugé à nouveau à 35.000 g pendant 5 heures à 4°C . Le culot est homogénéisé en tampon Tris HCl 0,025 M ; MgCl_2 0,01 M ; pH 7,6 au moyen d'un broyeur de type DOUNCE (508 μ) et dilué de manière à obtenir une concentration en protéines approximative de 15 mg/ml.

Le dosage des protéines est réalisé selon la technique de Lowry et coll. (1951) après solubilisation de la suspension en faisant agir durant 30 minutes du sodium dodecyl sulfate à la concentration de 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La préparation est enfin répartie par fractions de 1 ml et conservée à -20°C .

b) Marquage des hormones

La prolactine PRL - NIH - B4* et l'hormone de croissance GH-NIH-B18* sont utilisées à la fois comme traceur et comme standard de référence.

Le marquage à l'iode 125 est réalisé selon la technique à la lactoperoxydase de Thorell et Johanson (1971). En résumé, les opérations se déroulent de la manière suivante :

la réaction s'effectue dans un tube en polystyrène de 8 x 40 mm.

A 25 μg d'hormone diluée dans 25 μl de tampon phosphate sodico-potassique 0,05 M pH 7,5 on ajoute successivement :

— 25 μl de tampon phosphate sodico-potassique 0,5 M pH 7,5

— 10 μl d' NaI^{125} correspondant à 1 millicurie (Amersham IMS 30)

— 10 μl de lactoperoxydase (0,5 μg) Boehringer (160 U/mg) diluée en tampon

* Nous remercions le « National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases » et le « College of American Pathologists » qui nous ont aimablement fourni ces hormones.

* Nous remercions la firme Sandoz qui nous a fourni gracieusement le Parlodel.

phosphate sodico-potassique 0,05 M ;
pH 7,5.

- 5 µl d'H₂O₂ à la concentration 1/30.000 (perhydrol Merck)
- puis la solution est agitée doucement pendant 2 minutes
- nouvelle addition de 5 µl d'H₂O₂ à 1/30.000
- agitation pendant 2 minutes.

Enfin, les produits du marquage sont déposés en haut d'une colonne (10 x 350 mm) de Sephadex G-75 (Pharmacia) préalablement équilibrée en Tris HCl 0,025 M ; MgCl₂ 0,01 M ; pH 7,6 ; 0,1 % b.S.A. (albumine sérique bovine, fraction V de Cohn).

La colonne est lavée avec le même tampon et l'éluat est collecté en fractions de 1 ml qui sont immédiatement diluées 10 fois et congelées à — 20°C. Pour les dosages, on n'utilise que la fraction donnant le pourcentage de liaison spécifique maximum en présence d'une suspension de récepteurs correspondant à 1 mg de protéines. En général, aussi bien pour la prolactine que pour l'hormone de croissance, le pourcentage de liaison spécifique de l'hormone marquée aux récepteurs par rapport à la quantité totale de traceur mise en présence dépasse 25 %.

c) Dosage proprement dit

- Le tampon Tris HCl 0,025 M ; MgCl₂ 0,01 M ; pH 7,6 ; 0,1 % b.S.A. ; 0,01 % de sulfate de néomycine est utilisé pour toutes les dilutions.
- Le dosage est réalisé dans des tubes en polystyrène ayant les dimensions suivantes : 13 x 70 mm.
- Le volume d'incubation est toujours de 500 µl.
- Les réactifs sont ajoutés dans l'ordre suivant :
 - 100 µl de standard de référence ou d'extrait à doser
 - 200 µl de tampon
 - 100 µl d'hormone marquée (traceur) bGH* ou bPRL* correspondant à 15.000 cpm

— 100 µl de la suspension de récepteurs correspondant environ à une concentration de 125 µg de protéines.

Ensuite les tubes sont incubés durant la nuit (16 à 20 heures) à température ambiante.

Après quoi, le milieu est dilué par l'addition de 3 ml de tampon froid (4°C) et les tubes sont immédiatement centrifugés à 2.000 g pendant 20 minutes (4°C). Le culot est à nouveau lavé par 3 ml de tampon, centrifugé et enfin sa radioactivité est déterminée au moyen d'un compteur de scintillation gamma.

2. Mise au point d'une colonne d'affinité antialbumine sérique bovine

a) Production d'un antisérum antialbumine sérique bovine

Trois lapins, âgés de 5 à 6 mois, ont été immunisés suivant les techniques de Ross et coll. 1971 et Vaitukaitis et coll. 1971 au moyen de 500 µg de b.S.A. (Boehringer n° 238040) diluée dans 500 µl de NaCl 9 ‰ et 500 µl d'adjuvant complet de Freund (Difco).

Les injections ont été répétées 3 fois, à 2 semaines d'intervalle, puis trois mois après la première immunisation, les lapins ont été sacrifiés et le maximum de sang récolté. Le sérum obtenu (50 à 70 ml) a été titré selon la technique d'Ouchterlony (1948).

Comme les trois antisérums avaient des titres équivalents, nous les avons mélangés. Les gamma globulines ont été précipitées par le sulfate d'ammonium (Kerwick R.A. 1940) puis purifiées par chromatographie sur DEAE- Sephadex A -50 (Pharmacia) en acétate de sodium 0,05 M ; pH 5.

b) Activation du Sepharose 4B

Le Sepharose 4B a été activé au bromure de cyanogène selon la technique de Axen et coll. (1967). Les opérations se déroulent comme suit :

- 50 g. de CNBr sont solubilisés dans 2 litres d'eau désionisée sous agitation constante (± 20 à 30 min.).

- 175 ml (environ 50 g.) de Sepharose 4B (Pharmacia) sont ajoutés en une fois.
- Le pH est amené entre 10 et 11 et maintenu dans cette zone par addition continue d'une solution 0,2 M de NaOH (environ 500 ml) pendant une période de 5 à 6 minutes.
- Le Sepharose 4B est lavé sur un filtre en verre fritté au moyen d'eau désionisée froide (5 litres).
- ensuite par de l'acétone 50 % (5 litres)
- enfin au moyen du tampon NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M ; pH 8 (10 litres).

c) Couplage des gamma globulines au Sepharose activé

Les protéines à coupler diluées dans le tampon NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M ; pH 8 sont mises en présence du Sepharose 4B activé au CNBr dans les proportions de 15 mg. de gamma globulines par 5 ml de gel. La solution est maintenue sous rotation lente (25 tours par minute) pendant 24 à 36 heures à 4°C.

Le Sepharose 4B activé, couplé aux gamma globulines antialbumine sérique bovine est alors lavé sur un filtre en verre fritté afin d'éliminer les protéines non couplées au Sepharose ($\pm 15\%$ en moyenne).

Ensuite, les sites non occupés sont saturés par une solution 0,1 M d'éthanolamine pH 8 pendant 1 à 2 heures puis le gel est lavé successivement avec du NaHCO_3 0,1 M ; pH 8 puis avec du tampon acétate de sodium 0,1 M ; pH 4 pendant 1 à 2 heures et enfin repris en tampon Tris HCl 0,02 M ; MgCl_2 0,005 M ; pH 7,5 ; NaN_3 0,02 % et stocké à 4°C. Pour calculer la capacité de liaison du Sepharose 4B-anti b.S.A. une colonne de 16 x 125 mm équilibrée en Tris HCl 0,02 M ; MgCl_2 0,005 M ; pH 7,5 est chargée avec une solution à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de b.S.A. dans le même tampon. Le Sepharose 4B-anti b.S.A. est capable d'épuiser 140 ml de solution correspondant au total à 14 mg d'albumine soit $\pm 0,6$ mg de b.S.A. par ml de gel.

RESULTATS

a. Extraction

Les utérus ont été prélevés à l'abattoir et placés immédiatement dans un bac de glace pour être ramenés au laboratoire dans les plus brefs délais. Ensuite, ils ont été disséqués soigneusement et l'activité hormonale a été dosée dans les parties

TABLEAU 1. — Dosage de l'activité hormonale et des protéines dans les différentes parties du placenta*.

	éq. PRL-NIH-B4 en mg/kg tissu	éq. GH-NIH-B18 en mg/kg tissu	Protéines extraites en mg/kg tissu
Cotylédons fœtaux	25,7	76,35	40 600
Cotylédons maternels	7	20	55 340
	éq. PRL-NIH-B4 en mg/litre	éq. GH-NIH-B18 en mg/litre	Protéines totales en mg/litre
Liquide amniotique	< 0,02 **	< 0,03 **	260
Liquide allantoïdien	< 0,11 **	< 0,19 **	2 920
Plasma fœtal	< 0,07 **	< 0,2 **	n.d. ***

* Les dosages ont été effectués à partir de 13 placentas d'âges différents (de 2,5 à 8 mois).

** Plusieurs valeurs se situent en dessous de la sensibilité du dosage.

*** Non déterminé.

suivantes : cotylédons fœtaux et maternels, liquides allantoïdiens et amniotiques et enfin sang fœtal. Les résultats repris dans le tableau 1 indiquent que les cotylédons fœtaux sont les plus riches en hormone. Ce sont donc ceux-ci qui ont servi de matériel de départ pour l'extraction.

Il restait à déterminer quelle époque de la gestation était la plus favorable pour le prélèvement. Le meilleur moment se situe apparemment entre le 3^e et le 7^e mois (tableau 2), l'extrait de placenta plus jeune est en outre beaucoup trop visqueux tandis que celui provenant de

placenta plus âgé contient beaucoup d'hémoglobine.

En vue de déterminer les conditions optimales d'extraction, nous avons réalisé quelques essais en faisant varier le pH et le nombre d'extractions (tableau 3). Pour les extractions ultérieures, nous avons appliqué le procédé n° 6 qui donne le meilleur résultat si on considère la quantité d'hormone extraite par rapport à la durée des manipulations.

Ces premiers résultats nous ont permis d'établir un plan d'extraction définitif dont voici les différentes phases. Toutes les opérations sont réalisées à ± 4 °C.

TABLEAU 2. — Teneur hormonale des cotylédons fœtaux en fonction du moment de la gestation.

Age du fœtus en mois	Eq. PRL-NIH-B4 en mg/kg	Eq. GH-NIH-B18 en mg/kg	Protéines extraites (Lowry) en mg/kg
2,5	23	75	39 400
2,5	17,5	75	28 000
2,75	14,5	—	22 700
2,9	18	57,5	34 900
3	15	—	29 600
3	23	120	41 000
3,6	23,5	90	40 200
4,5	25	52,5	30 400
5	40	—	45 500
7 (jumeaux)	28,5	57	47 800
8	34,5	85	87 200

Trois à cinq kilos de cotylédons fœtaux sont lavés avec une solution de NaCl 9 ‰ pour éliminer le sang puis broyés dans une machine à hacher la viande (modèle de ménage). Ensuite, ils sont homogénéisés dans un broyeur de type Sorvall (1,2 litre) à la vitesse de 12 000 tours par minute pendant 30 secondes dans du tampon NH_4HCO_3 0,1 M

ajusté à pH 9,5 avec du NH_4OH . La proportion du tissu par rapport au tampon est de 1/5 (poids/volume).

La suspension de tissu broyé dans le tampon est agitée durant la nuit puis centrifugée à 13 000 g pendant 40 minutes. Le liquide surnageant est récupéré avec soin et le culot est éliminé.

TABLEAU 3. — Teneur hormonale des cotylédons en fonction du procédé d'extraction.

N ^o	Procédé d'extraction utilisé	Quantité d'hormone extraite en mg/kg de cotylédons							
		pH 1 ^{re} extract.	pH 2 ^e extract.	1 ^{er} extrait		2 ^e extrait		Total ext. 1 + ext. 2	
				éq. GH*	éq. PRL*	éq. GH*	éq. PRL*	éq. GH*	éq. PRL*
1	en CH ₃ COONH ₄	5	—	3,6	1,3	—	—	3,6	1,3
2	en CH ₃ COONH ₄ puis en NH ₄ HCO ₃	5	9,5	3,3	1,5	19	6	22,3	7,5
3	en CH ₃ COONH ₄ puis en NH ₄ HCO ₃	6	9,5	46	18	52,5	19,5	98,5	37,5
4	en CH ₃ COONH ₄ puis en NH ₄ HCO ₃	6	10,5	44,7	17,6	55	18	99,7	35,6
5	en CH ₃ COONH ₄ puis en NH ₄ HCO ₃	6,5	9,5	55,5	21	52	14	107,5	35
6	en NH ₄ HCO ₃	9,5	—	78	29	—	—	78	29
7	en NH ₄ HCO ₃	9,5	9,5	82	25	31	13	113	38
8	extraction en NH ₄ HCO ₃ de cotylédons lyophilisés	9,5	—	71	27	—	—	71	27

éq. GH* = éq. GH-NIH-B18

éq. PRL* = éq. PRL-NIH-B4

TABLEAU 4. — Teneur hormonale au cours des différentes étapes de l'isolement.

Etape de l'isolement	Protéines totales (Lowry) en mg	Activité hormonale		Récupération de l'activité hormonale en %	Facteur d'enrichissement
		éq. PRL-NIH-B4 en mg	éq. GH-NIH-B18 en mg		
1 kg cotylédons fœtaux extraits NH_4HCO_3 0,1 M ; pH 9,5	42 500	28,5	85	100	1
Précipité 65 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8 500	14,9	40	48,3	2,4
DEAE-Sephadex A-25 Fraction III (0,1 M)	1 390	8	23,4	27,6	8,46
Phenyl-Sepharose CL-4B	193	4,3	14,9	16,9	37,2
Blue Sepharose CL-6B	9	2,8	7,8	9,3	433
Anti-b.S.A.-Sepharose 4B	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M̄atrex Gel Red A	1,4	1,25	4,4	4,9	1 510

Les résultats repris dans ce tableau sont exprimés par kg de cotylédons fœtaux, ils correspondent à la moyenne de 3 purifications différentes portant sur 4,8 ; 4,3 et 3,5 kg de cotylédons.

Le facteur d'enrichissement est calculé en rapportant l'activité spécifique (activité hormonale/protéines totales) de chaque étape de la purification à celle de l'extrait initial.

n.d. : non déterminé.

b. Précipitation au sulfate d'ammonium

Des nombreux essais effectués, il ressort que les concentrations optimales de sulfate d'ammonium se situent entre 35 et 65 % de saturation.

Du sulfate d'ammonium sec est ajouté doucement et sous agitation constante pour atteindre 35 % de saturation (209 g/l).

Après 4 heures, les protéines ayant précipité sont écartées par centrifugation (10 000 g/30 min) et du sulfate d'ammonium est ajouté au surnageant pour atteindre 65 % de saturation (200 g/l).

Après dissolution complète du sel, la solution est abandonnée telle quelle durant la nuit et ensuite centrifugée pour obtenir le précipité.

Les résultats sont résumés dans le tableau 4.

c. Dialyse

Le précipité est solubilisé dans un volume d'environ 4 litres de tampon NH_4HCO_3 , 0,06 M ; pH 9,5 pour 5 kg de cotylédons soit à une concentration approximative de 10 mg de protéine par ml.

La solution est dialysée dans des membranes Visking tubing (20 × 300 mm, Union Carbide) contre un volume de 20 litres de tampon renouvelé 5 fois à 5 heures d'intervalle. Après dialyse, la solution qui ne contient plus de sulfate d'ammonium est centrifugée à 27 000 g pendant 120 minutes pour éliminer les protéines qui ont floclulé.

d. Chromatographie sur (diéthylaminoéthyl) DEAE - Sephadex A-25

Les protéines (50 à 60 g) sont chargées sur une colonne (100 × 200 mm)

de DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) préalablement équilibrée dans le même tampon (NH_4HCO_3 , 0,06 M ; pH 9,5).

Après le chargement, la colonne est lavée avec approximativement 20 litres de tampon jusqu'à ce que la densité optique de l'éluat lue à 280 nm soit inférieure à 0,08. Le volume récolté (\pm 25 litres) constitue la fraction I. Ensuite, la force ionique du tampon est augmentée pour atteindre la molarité de 0,075 en NH_4HCO_3 à pH 9,5. La colonne est lavée avec environ 20 à 30 litres du nouveau tampon jusqu'à ce que la densité optique (280 nm) de l'éluat soit inférieure à 0,08. Le volume récolté (\pm 25 litres) constitue la fraction II. La force ionique est à nouveau augmentée pour atteindre la molarité de 0,1 en NH_4HCO_3 à pH 9,5. La colonne est lavée jusqu'à ce que la densité optique (280 nm) soit inférieure ou égale à 0,08. Le volume récolté (\pm 35 litres) constitue la fraction III. Enfin un dernier tampon de force ionique NH_4HCO_3 , 0,1 M ; pH 9,5 ; NaCl 0,3 M est appliqué sur la colonne pour éluer le restant des protéines accrochées. Les dosages des protéines totales et de l'activité hormonale sont effectués sur chaque fraction.

La fraction III contenant le maximum d'hormone est concentrée dans une cassette Millipore (porosité de la membrane P.M. 10 000 surface 2 325 cm²) jusqu'à un volume final de 1 000 ml environ correspondant à une concentration de 8 à 10 mg de protéines par ml.

Les résultats apparaissent dans le tableau 4.

e. Chromatographie sur Phenyl-Sepharose CL-4B

Après la chromatographie sur DEAE, les protéines se retrouvent dans un tampon dont la force ionique et le pH sont relativement élevés, si bien qu'il nous a semblé logique d'appliquer à ce stade une chromatographie d'hydrophobicité. A la fraction contenant l'activité hormonale (DEAE 0,1 M) nous ajoutons du NaCl à la concentration 0,1 M et du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jusqu'à obtenir la concentration 1 molaire. La solution est chargée

sur une colonne de Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia) préalablement équilibrée dans le même tampon. Ensuite, le lavage est réalisé selon un gradient linéaire de 2 × 2 litres où le tampon A est du tampon de chargement et le tampon B du NH_4HCO_3 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; pH 9,5 dilué à 50 % dans de l'éthylène glycol. L'éluat est récolté par fractions de 25 ml. La densité optique ainsi que la concentration en activité hormonale sont déterminées sur chacune des fractions. Les résultats apparaissent dans la figure 1 et le tableau 4.

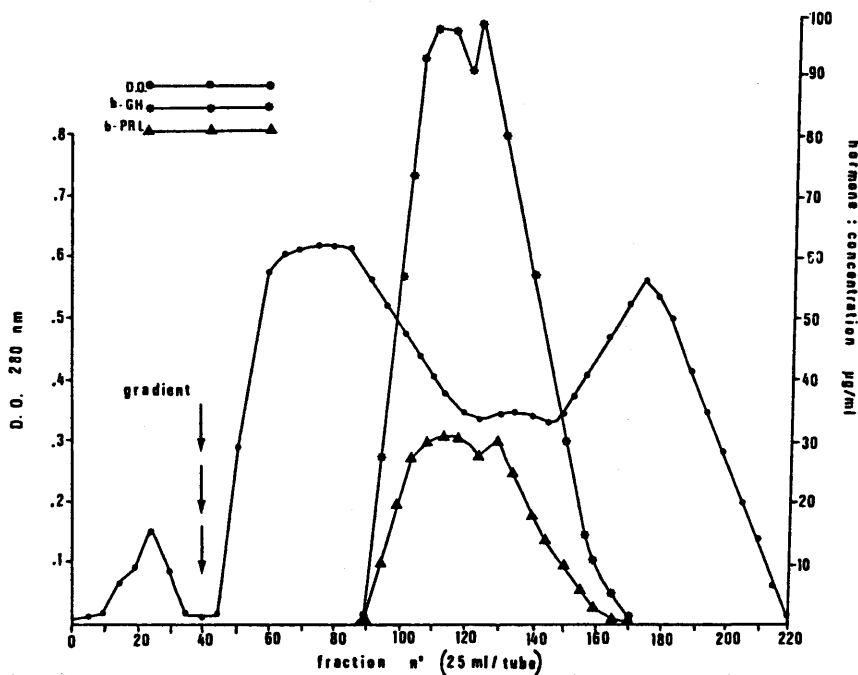


Fig. 1. — Chromatographie sur Phenyl-Sepharose CL-4B.

La colonne (50 × 150 mm) est équilibrée en NH_4HCO_3 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M ; pH 9,5. Après chargement de plus ou moins 5 g de protéines, la colonne est lavée par 500 ml du tampon d'équilibration, puis éluée par un gradient linéaire de 2 fois 2 litres ; le tampon A est le tampon d'équilibration et le tampon B est du NH_4HCO_3 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; pH 9,5 dilué à 50 % dans de l'éthylène glycol.

Débit : 120 ml/heure. Température : 4 °C.

f. Chromatographie sur Blue-Sepharose CL-6B

Les fractions riches en activité sont mélangées puis concentrées par ultrafiltration jusqu'à un volume de 250 ml (5 mg de protéines par ml). Ensuite, la solution est traitée par gel filtration sur une colonne (80 × 200 mm) de Sephadex G-25 Fine pour amener les protéines en tampon Tris HCl 0,02 M ; MgCl₂ 0,005 M ; pH 7,5.

Une colonne (60 × 200 mm) de Blue-Sepharose CL-6B (Pharmacia) préalablement équilibrée dans le même tampon est chargée avec la solution puis lavée avec le tampon jusqu'à ce que la densité optique (235 nm) soit inférieure à 0,05. A ce moment, un gradient linéaire de force ionique (2 × 2 litres) est établi. Le tampon A est le même tampon de départ, tandis que le tampon B est constitué de

Tris HCl 0,02 M ; MgCl₂ 0,005 M ; pH 7,5 ; KCl 0,3 M.

Les résultats apparaissent dans la figure 2 et le tableau 4.

g. Chromatographie d'affinité sur Sepharose 4B antialbumine sérique bovine

A ce stade de la purification, la préparation présente en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Ornstein 1964 et Davis 1964) une faible bande supplémentaire qui correspond à la b.S.A. (Fig. 3).

En immunodiffusion sur gel d'Agar, la même préparation présente à partir d'une concentration supérieure à 50 µg une zone de précipitation avec l'antisérum anti b.S.A. Cette contamination relativement faible ± 2 % peut néanmoins être gênante lors de la production d'antisérum. Afin d'éliminer ce contaminant nous

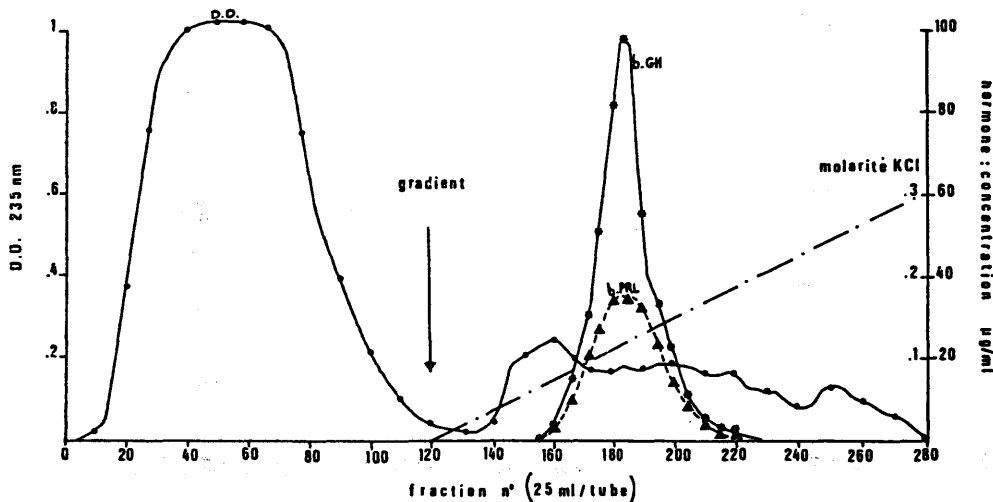


Fig. 2. — Chromatographie sur Blue-Sepharose CL-6B.

La colonne (60 × 200 mm) est équilibrée en Tris HCl 0,02 M ; MgCl₂ 0,005 M ; pH 7,5. Après chargement de plus ou moins 0,8 g de protéines, la colonne est lavée par le tampon d'équilibration puis éluée par un gradient linéaire de 2 fois 2 litres, le tampon A est le tampon d'équilibration, le tampon B est le tampon A additionné de KCl 0,3 M.

Débit : 180 ml/heure. Température 4 °C.

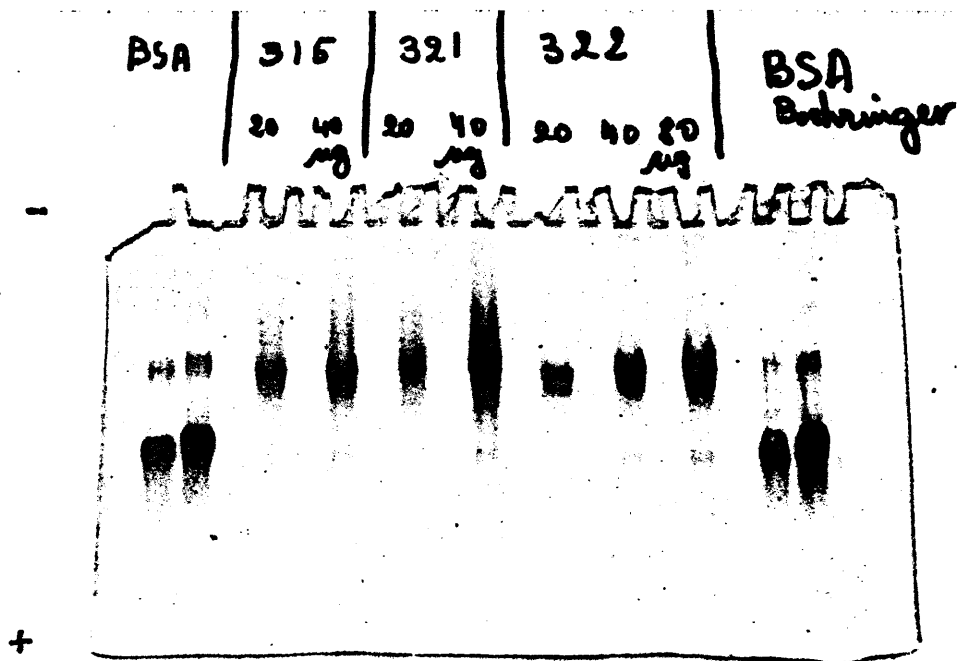


Fig. 3. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (acrylamide 7,5 % + 2,5 % de bisacrylamide dans l'acrylamide) réalisée en tampon glycine 0,5 M ajusté à pH 8,3 avec du Tris. La migration est poursuivie durant 5 heures à 10 V/cm et à 4°C.

La figure représente la migration de 3 préparations de H.P.S.M. (315, 321, 322) entourée de 2 échantillons de b.S.A. Boehringer.

avons utilisé l'épuisement par chromatographie d'affinité sur Sepharose 4B anti-albumine sérique bovine. La production et la capacité de liaison de l'immunoabsorbant ont été décrites ci-dessus.

Les fractions riches en activité provenant de la colonne Blue-Sepharose sont mélangées et concentrées par ultrafiltration (cellule Millipore 70 mm membrane P.M. 10 000 pression 4 bars) jusqu'à un volume de 30 ml (2 à 3 mg protéines par ml).

La solution est traitée par filtration sur gel de Sephadex G-25 (colonne 15

× 250 mm) et amenée en tampon Tris HCl 0,02 M ; MgCl₂ 0,005 M ; pH 7,5. La colonne anti b.S.A. (6 × 80 mm) est équilibrée en tampon Tris et lavée abondamment, la solution est chargée avec un débit de 2 ml par heure. Après lavage du gel, la solution est chargée directement sur la dernière colonne.

h. Chromatographie sur Matrex Gel Red A

A ce stade de la purification, le produit présente encore une couleur légèrement brunâtre qui est probablement due à la

présence d'hémoglobine. Afin de trouver un moyen d'éliminer cette protéine nous avons utilisé la chromatographie sur \bar{M} atrex Gel Red A (Amicon).

La colonne (15 × 100 mm) préalablement équilibrée en Tris HCl 0,02 M ; $MgCl_2$ 0,005 M ; pH 7,5 est chargée avec la solution (\pm 40 mg) provenant de l'épuisement par l'anti b.S.A. Sepharose. Après le chargement, le gel est lavé par

le tampon de départ puis élué par un gradient de force ionique (KCl 0,3 M ; 2 fois 500 ml).

Les résultats sont repris dans la figure 4 et le tableau 4.

Les fractions riches en activité sont mélangées et traitées par gel filtration sur Sephadex G-25 équilibré en NH_4HCO_3 0,01 M ; pH 8,5 (NH_4OH) puis lyophilisées.

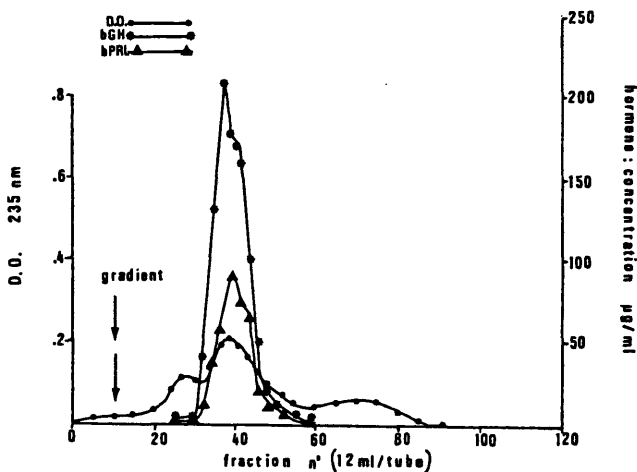


Fig. 4. — Chromatographie sur \bar{M} atrex Gel Red A.

La colonne (15 × 100 mm) est équilibrée en Tris HCl 0,02 M ; $MgCl_2$ 0,005 M ; pH 7,5. Après chargement de plus ou moins 40 mg de protéines, la colonne est lavée par le tampon d'équilibration puis éluée par un gradient linéaire de 2 fois 500 ml ; le tampon A est le tampon d'équilibration, le tampon B est le tampon A additionné de KCl 0,3 M.

Débit : 80 ml/heure. Température 4 °C.

DISCUSSION

Les dosages par la technique des radio-récepteurs de l'hormone de croissance et de la prolactine permettent de détecter la H.P.S.M. dans les extraits de placenta et de suivre l'enrichissement de la préparation en hormone au cours des différentes étapes de la purification. Dans les

deux systèmes de dosage, la H.P.S.M. se comporte de façon semblable. Elle inhibe la fixation de l'hormone radioactive GH* ou PRL* sur le récepteur selon une courbe non parallèle à celle obtenue avec les standards respectifs. Par conséquent, pour mesurer l'activité de la préparation, nous avons systématiquement retenu la valeur obtenue pour une inhibi-

tion de $\pm 50\%$ de la liaison. Au cours des différents stades de la purification, le rapport des deux activités (prolactinique et somatotrope) reste constant. Ce comportement de la H.P.S.M. permet d'affirmer qu'il s'agit bien de la même protéine qui possède simultanément la propriété de déplacer la prolactine et l'hormone de croissance de leurs récepteurs cellulaires.

L'extraction à partir des cotylédons fœtaux, riches en hormone a été effectuée en bicarbonate d'ammonium et à pH basique (9,5). En effet, l'extraction en pH acide donne de bien moins bons résultats. Lors de nos derniers essais, nous avons expérimenté avec succès l'extraction dans le sérum physiologique à pH 7,5. Cette façon de procéder permet d'éviter les vapeurs d'ammoniaque qui se dégagent des solutions de NH_4HCO_3 .

La précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium a été maintenue dans le schéma définitif de l'isolement, parce que cette méthode permet une réduction importante du volume de l'extrait.

Des essais préliminaires de filtration sur gel avaient fourni des résultats encourageants, cependant cette étape n'a pas été retenue dans le schéma définitif de purification parce qu'elle était mal adaptée au traitement de grosses quantités de protéines.

La première étape chromatographique de la purification consiste en une chromatographie par échangeurs d'ions. Nous avons choisi la DEAE-Sephadex A-25 parce que ce gel permet de travailler avec des débits élevés. Les différents essais réalisés avec cette résine à pH 7, 8 ; 8,5 ; 9,5 ; 10,5, en bicarbonate d'am-

monium ou de glycinate de sodium, en augmentant la force ionique par étape ou graduellement, nous ont permis de sélectionner une méthode procédant par étapes de force ionique croissante et de montrer que l'importance du pH de travail n'est pas déterminante.

Après la chromatographie sur DEAE, nous avons essayé plusieurs systèmes de chromatographie par échangeurs de cations CM et SP-Sephadex. Ces différents essais ont abouti à des résultats médiocres suite à l'insolubilisation d'une fraction importante des protéines lorsque le pH de la solution est inférieur à 6. De plus, nous avons constaté la perte d'une bonne partie de l'activité. Nous en avons conclu qu'à ce stade de l'isolement, il était préférable de maintenir la solution à un pH alcalin ou voisin de la neutralité.

Lors d'une tentative de purification par chromatographie d'adsorption sur hydroxyl-apatite, nous avons constaté une répartition de l'activité entre la plupart des fractions sans aucun enrichissement. Parallèlement, un essai de chromatographie d'affinité sur Con-A-Sepharose réalisé dans l'espoir de débarrasser la préparation des glycoprotéines qu'elle était susceptible de contenir, s'est révélé inutile.

Les conditions de la chromatographie d'hydrophobicité permettaient de maintenir les protéines en solution dans un tampon favorable ($\text{pH} \geq 7,5$, force ionique relativement élevée). Nous avons d'abord choisi une colonne d'Octyl-Sepharose CL-4B. Toutefois sur ce gel, une fraction des protéines et en particulier l'hormone recherchée ne sont pas éluées par une solution d'éthylène-glycol à 50%. Des essais de chromatographie sur Phényl-Sepharose CL-4B se sont mon-

trés nettement plus favorables et cette méthode a été conservée dans le schéma définitif d'isolement.

Après la chromatographie sur Phényl-Sepharose CL-4B, le niveau d'activité hormonale est encore peu élevé et de plus la préparation reste contaminée par d'autres protéines parmi lesquelles nous retrouvons de l'albumine et l'hémoglobine.

Nous référant aux travaux de Travis et coll. (1973), nous avons utilisé la Blue-Sepharose CL-6B en présence de NaCl 0,5 M et avons constaté que la b.S.A. n'était pas retenue sur la colonne.

Suite à cet échec, nous avons diminué la molarité du tampon. Dans ces conditions, la H.P.S.M. se lie au gel et peut être éluée en augmentant progressivement la concentration en KCl.

Afin d'éliminer complètement l'albumine, nous avons eu recours à une chromatographie d'affinité.

Pour terminer, la chromatographie sur Matrex Gel Red A permet un enrichissement de 3 à 4 fois en un temps qui peut être extrêmement court étant donné les débits très élevés de ce support et la petite taille de la colonne.

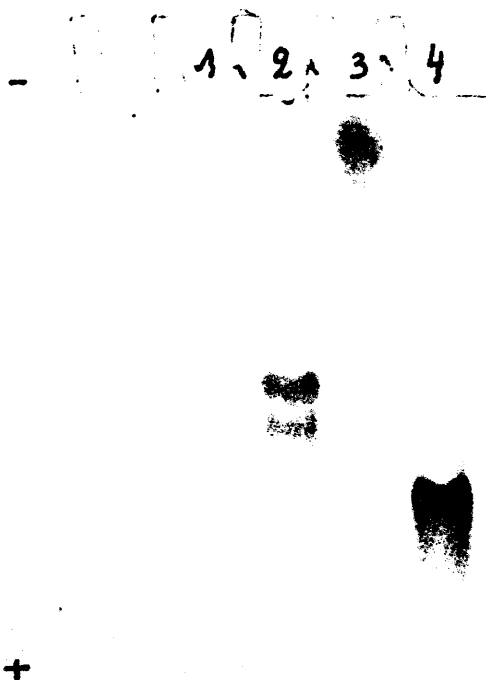


Fig. 5. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les conditions sont les mêmes que pour la Fig 3, sauf en ce qui concerne la durée de la migration qui est poursuivie durant 7 heures à 15 V./cm et à 0 °C. La figure représente la migration de :

- 1 = H.P.S.M.
- 2 = PRL-NIH-B4
- 3 = GH-NIH-B18
- 4 = albumine b.S.A. Boehringer.

CONCLUSION

Le tableau 4 résume les différentes étapes suivies pour réaliser l'isolement de la H.P.S.M. à partir des cotylédons : extraction aqueuse, précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie. Bien que le rendement de récupération de chacune de ces étapes soit faible, nous sommes arrivés à obtenir un facteur d'enrichissement d'environ 1 500

fois. Dans les dosages par radiorécepteurs, l'hormone purifiée possède une activité prolactinique comparable à celle du standard PRL-NIH-B4 et une activité somatotrope égale à plus ou moins trois fois celle du standard GH-NIH-B18. Cette même préparation présente un profil d'éluion symétrique après chromatographie sur Sephadex G-100 et une image relativement homogène (Fig. 5) en électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

BIBLIOGRAPHIE

- AXEN R., PORATH J. and ERNBACK S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of Cyanogen halides. *Nature*, 1967, **214**, 1302.
- BOLANDER F.F. and FELLOWS R.E. Purification and characterization of Bovine Placental Lactogen. *J. Biol. Chem.* 1976, **251**, 2703.
- DAVIS B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1964, **121**, 404.
- DJIANE J., DURAND Ph., KELLY P.A. Evolution of prolactin Receptors in Rabbit Mammary Gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology*, 1977, **100**, 1348.
- HAYDEN T.J. and FORSYTH I.A. Bovine Placental Lactogen: purification and characterization. *J. Endocr.*, 1979, **80**, 68 p. abs.
- KERWICK R.A. The serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem. J.* 1940, **34**, 1248.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
- ORNSTEIN L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1964, **121**, 321.
- OUCHTERLONY O. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of Diphtheria Bacteria. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1948, **25**, 186.
- ROSS G.T., VAITUKAITIS J.L., ROBBINS J.B. in proc. 2nd Int. symp. Protein and polypeptide hormones (Margoulies M. and Greenwood F.C. eds) ICS 241, part 1, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1971, p. 153-157.
- ROY B.P., GRINWICH D.L., MURTHY G.S., FRIESEN H.G. Studies on Bovine Placental Lactogen. program of the 59th Meeting of the Endocrine Society. 1977, abs 354.
- SHIU R.P.C., KELLY P.A., FRIESEN H.G. Radioreceptor Assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science*, 1973, **180**, 968.
- THORELL J.I. and JOHANSON B.G. Enzymatic Iodination of polypeptides with I^{125} to high specific activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1971, **251**, 363.
- TRAVIS J. and PANNELL R. Selective Removal of albumin from plasma by affinity chromatography. *Clin. Chim. Acta.*, 1973, **49**, 49.
- TSUSHIMA T. and FRIESEN H.G. Radioreceptor assay for growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1973, **37**, 334.
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. and ROSS G.T. A method for producing specific antisera with small doses immunogen. *J. Clin. Endocr.*, 1971, **33**, 988.

SUMMARY

Isolation of a bovine placental hormone having an activity similar to prolactin and growth hormone.

Isolation from bovine cotyledon extracts of an hormone with somatotrophic and mammatrophic activity was performed using various chromatographic procedures. To identify this hormone during the successive steps of purification, its prolactinic and somatotrophic activity was determined by radioreceptor assay. The purified hormone shows a prolactinic activity similar to that of PRL-NIH-B4 standard and a somatotrophic activity three times that of GH-NIH-B18 standard.