

**MOLÉCULES DE LA FAMILLE  
DES PROTÉASES ASPARTIQUES DANS LE PLACENTA  
DES RUMINANTS : HORMONES OU PROTÉINES ?**

par

J. F. BECKERS \*, R. M. ROBERTS, A. P. ZOLI, F. ECTORS (U.Lg)  
et J. DERIVAUX, membre titulaire

Contrairement à l'abondance des connaissances relatives au fonctionnement endocrinien du placenta chez les primates, celles relatives à celui des ruminants étaient, jusqu'il y a peu, restées assez limitées malgré les recherches menées à leur sujet. Pourquoi cette discrétion dans la manifestation humorale ou urinaire d'hormones ou de protéines trophoblastiques chez les ruminants, alors que leur placenta fourmille de cellules binucléées, trinuéées ou syncytiales dont la richesse en granulations PAS positives, déjà mises en évidence par Asheton (1906) et minutieusement décrites par Wimsatt (1951), témoigne d'une intense activité ?

Sans nous livrer à une analyse exhaustive de cette question, nous voudrions seulement montrer, au cours de cet exposé, comment nos recherches nous ont permis de mettre en évidence la présence dans ces espèces, d'une famille de glycoprotéines placentaires du groupe des protéases aspartiques.

***Existence d'une hormone chorionique gonadotrope  
chez les ruminants ?***

Cette question est déjà soulevée par Aschheim et Zondek en 1928 quand ils viennent de mettre en évidence l'hCG chez la femme enceinte ; ils recherchent la présence d'une éventuelle bCG dans l'urine de vache et le résultat est négatif. En 1930, Cole et Hart identifient la présence d'une hormone gonadotrope dans le sérum de la jument gestante : la PMSG. De nombreuses recherches sont dès lors entreprises sur le plasma ou sur l'urine des ruminants : Foster en fera une revue syn-

(\*) Invité par le Bureau en vertu de l'article 84 du Règlement.

thétique dans une publication parue en 1956 avec la conclusion d'une absence de sécrétion d'hormone gonadotrope placentaire dans ces espèces.

La question n'est cependant pas réglée. En 1963, Foote et Kaushik, travaillant sur des extraits de cotylédons bovins et appliquant le test de Parlow, mettent en évidence l'existence à ce niveau d'une substance à activité gonadotrope de type LH ; cette observation sera confirmée par Lunnen et Foote en 1967. En 1983, Ailenberg et Shemesh, travaillant également sur des cotylédons prélevés entre le 50<sup>e</sup> et le 100<sup>e</sup> jour de la gestation chez la vache, isolent une substance thermolabile d'un poids moléculaire d'environ 60.000 daltons, possédant une activité biologique de type lutéotrope. Ils publient leurs observations dans un article intitulé : « Partial purification of a chorionic gonadotropin-like protein from bovine cotyledons » et concluent à l'existence, chez la vache gestante, d'une hormone gonadotrope dont le rôle est vraisemblablement « d'assurer » le maintien du corps jaune gestatif. Partant de l'observation faite par Oxender *et al.* (1972) de la réduction de sécrétion de gonadotropines hypophysaires au cours de la gestation, et de l'hypothèse déjà émise par Nalbandov et Casida (1948) que cette réduction fonctionnelle de l'hypophyse devait être compensée par la prise en charge d'un autre organe ou tissu, nous nous sommes, dès 1980, intéressés à ce problème.

Notre objectif de départ fut de chercher à isoler et à purifier, à partir de placentas bovins, une substance à activité lutéotrope biologiquement active permettant de développer un dosage radioimmunologique homologue et spécifique, applicable à la détermination des concentrations fœtales et maternelles de la molécule.

La purification d'une hormone protéique dépend de l'optimisation des séparations mises en œuvre et les chances de succès de sa mise en évidence relèvent pour une bonne part de la rapidité du dosage de chacune des fractions.

La mise en évidence d'une activité hormonale peut faire appel à diverses techniques : biologiques, par radioimmunologie, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Cette dernière méthode présente l'avantage de la simplicité et de la rapidité d'exécution et elle reste proche du dosage biologique par son principe de base de reconnaissance de l'hormone ; nous l'avons adoptée dans ce programme.

Développé en utilisant la LH bovine radiomarquée, le dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs de corps jaune bovin s'est avéré sensible et spécifique : détection de 0,5 ng de LH hypophysaire ; la FSH n'interfère que par sa contamination en LH soit environ 0,5 %.

Ce type de dosage convient parfaitement aux hormones placentaires hCG et PMSG lesquelles entraînent une inhibition à partir de 2 mUI et 20 mUI respectivement.

Le niveau d'activité obtenu à partir de l'extrait total est relativement faible du fait de la contamination par d'autres protéines, ce qui nous a conduits à faire subir à la préparation une série de purifications dont les diverses étapes sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Activité hormonale de la préparation au cours des différentes étapes de l'isolement, facteur d'enrichissement de l'hormone.

|                                            | Activité *<br>hormonale  | Facteur de<br>purification | Enrichissement<br>global |
|--------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Extrait de placenta                        | $2,3 \cdot 10^{-6}$      | 1,0                        | 1                        |
| Précipité 20-40 % S.A.                     | $48,0 \cdot 10^{-6}$     | 20,0                       | 20                       |
| DEAE Sephadex<br>(fraction non adsorbée)   | $216,5 \cdot 10^{-6}$    | 4,7                        | 94                       |
| Blue Sepharose                             | $840,0 \cdot 10^{-6}$    | 3,8                        | 365                      |
| Concanavallin<br>(fraction glycoprotéique) | $1250,0 \cdot 10^{-6}$   | 1,5                        | 543                      |
| ACA 34 (2 <sup>e</sup> pic)                | $1905,0 \cdot 10^{-6}$   | 1,5                        | 828                      |
| Mono Q                                     | $11906,0 \cdot 10^{-6}$  | 6,2                        | 5175                     |
| Phényl Supcrose 12                         | $202402,0 \cdot 10^{-6}$ | 17,0                       | 87975                    |

\* L'activité hormonale est exprimée en équivalent LH (standard de référence) par mg de protéines totales (méthode Lowry).

Cette protéine gonadotrope placentaire ne peut être confondue avec la LH (qui, selon certaines hypothèses, aurait pu éventuellement se fixer et s'accumuler dans le placenta) car elle ne réagit pas dans le dosage radioimmunologique de la LH. De plus, en immunodiffusion radiale en gel de gélose, il ne se forme aucun arc de précipitation entre cette « hormone gonadotrope placentaire » et l'antisérum anti-LH. Par contre, et ceci indique une parenté entre la LH et cette protéine placentaire, les deux antisérums — produits à partir de cette protéine et testés — présentent une réaction croisée avec la LH hypophysaire.

Il apparaît dès lors que sans être identique à la LH bovine, la protéine gonadotrope placentaire présente certains caractères la rapprochant de l'hormone gonadotrope hypophysaire à savoir :

- a) liaison aux récepteurs du corps jaune ;
- b) parenté immunologique ;
- c) même comportement au cours de la chromatographie sur DEAE et précipitation au sulfate d'ammonium.

De plus, l'analyse — par liaison radiocompétitive aux récepteurs de corps jaune — de différentes dilutions d'extraits de cotylédons bovins, nous a fourni une courbe parallèle à celle obtenue avec la LH hypophysaire, ce qui conduisait logiquement à penser que l'extrait cotylédonnaire renfermait une substance hormonale d'activité de type LH.

### *Existence de protéines dépourvues d'activité hormonale et associées à la gestation chez les ruminants.*

A la même époque, Buttler *et al.* (1982), en quête d'antigènes spécifiques de la gestation chez les bovins, mettent en évidence l'existence de deux protéines répondant à différents critères de spécificité placentaire, qu'ils dénomment PSPA et PSPB (pregnancy specific proteins A and B).

Il s'avèrera ultérieurement que la PSPA n'est autre que l'*a*-fœto-protéine et que la PSPB est d'un grand intérêt clinique en tant que marqueur spécifique de la gestation chez les bovins (Sasser *et al.* 1987).

Quant à nous, toujours incertains sur l'identité de l'hormone chorionique gonadotrope bovine, nous avons poursuivi nos recherches en élargissant le champ de nos investigations, en privilégiant une méthode visant à isoler simultanément plusieurs protéines placentaires sur base de critères immunologiques, et en développant des contrôles permettant d'établir leur appartenance sinon exclusive, du moins principale, à cet organe.

La technique adoptée fut la suivante :

- 1) extraction des protéines solubles du placenta ;
- 2) fractionnement par précipitation à partir de sulfate d'ammonium à des concentrations de 40 et 80 % ;
- 3) séparation de ces protéines par chromatographie sur résine échangeuse d'anions (DEAE Sephadex) ;
- 4) élimination dans chaque fraction, par chromatographie d'affinité, de protéines connues, vis-à-vis desquelles nous disposions d'anti-sérums (albumine sérique, hémoglobine, immunoglobines, hormone lactogène placentaire) ;

- 5) immunisation de lapins par injections répétées de petites quantités (500  $\mu\text{g}$ ) de chacune des fractions obtenues ;
- 6) récolte des sérums à intervalles de temps réguliers et leur utilisation dans des tests d'immunodiffusion radiale, d'immunoélectrophorèse et de type radioimmunologique.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence deux protéines :

— la première présentait une activité gonadotrope de type LH et correspondait en tout point à la protéine que nous venons de décrire en détail ;

— la seconde semblait dénuée d'activité hormonale et apparaissait dans le sérum des femelles gestantes.

Rapidement, il s'est avéré qu'elle pouvait être détectée dans le sérum dès le 30<sup>e</sup> jour de la gestation et que son taux ne cessait d'augmenter jusqu'au terme de celle-ci ; nous avons dénommé cette protéine PAG (protéine associée à la gestation). Elle peut servir à la détection de la gestation et les résultats des diagnostics établis par dosages sont concordants dans 98 % des cas avec ceux établis par échographie ou par palpation (Zoli *et al.*, 1992).

Isolée et purifiée à Bruxelles puis à Liège, grâce à la contribution du Dr A. P. Zoli, la protéine associée à la gestation fut séquencée à l'Université de Mons dans le service du professeur Falmagne. La comparaison de sa séquence N-terminale, établie sur 39 acides aminés, ne permit d'établir aucune similitude avec des protéines connues (Zoli *et al.* 1991).

De cette époque date notre collaboration avec le professeur Roberts, de l'Université de Missouri, en vue d'identifier, de cloner le gène de la protéine, et de le séquencer. Les bibliothèques d'ADN complémentaire (ADNC) des conceptus bovins et ovins isolés sur vecteur lambda GTII, sont constituées selon la méthode de Imakawa *et al.* (1987 et 1989). Les bibliothèques d'ADNC des tissus cotylédonnaires bovins et ovins sont constituées sur vecteur lambda ZADII à partir d'ARN polyadénylé (Warren *et al.* 1990). Les bibliothèques d'ADNC des conceptus sont criblées au moyen des antisérums anti-b et anti-OPAG, les ADNC sont sous-séquencés et séquencés dans les deux directions par la méthode de séquençage par terminaison de chaîne au moyen de désoxyribonucléotides. Les bibliothèques d'ADNC cotylédonnaires bovins et ovins sont criblées de manière séquentielle avec les ADNC isolés des bibliothèques des conceptus, et marquées au p32. Les clones purifiés et marqués positivement par les deux sondes sont transformés

en phagémides dans le bactériophage lambda ZAPII par les procédures d'excision *in vivo*, décrites par Short *et al.* en 1988. Les clones sont ensuite entièrement séquencés.

Des inserts des ADNC de plusieurs clones positifs qui ont réagi avec des antisérums anti-bPAG et anti-oPAG sont séquencés. Aucun de ces ADNC n'a une longueur de plus de 300 ppb, mais les ADNC ovins et bovins sont quasi identiques au niveau des régions où les deux séquences sont superposables (environ 86 % d'identité). Le clone ovin isolé est constitué de 1266 ppb et consiste en un segment 5' non transcrit de 20 ppb, une phase ouverte de lecture de 1146 ppb et une extrémité 3' de 100 ppb. Le clone bovin le plus long (ppb 314) commence par le T du cordon d'initiation ATG et possède une extrémité 3' complète.

Les ADNC des PAG bovins et ovins ont une identité de 86 % au niveau de la séquence nucléotidique et potentiellement codent pour des polypeptides longs de 382 et 380 acides aminés ayant des poids moléculaires de 42.985 et 42.852 respectivement (Xie *et al.*, 1991). Des recherches dans le GENBANK ont révélé que la PAG appartient à la famille des protéases aspartiques et ressemble de façon évidente aux pepsinogènes humains, porcins et simiens ainsi qu'à la cathepsine E, aux chymosines et à la cathepsine D humaine, et ceci plus particulièrement au niveau des deux régions du site actif des protéases aspartiques où les résidus voisins des acides aminés « acide aspartique » sont hautement conservés. Cependant, la PAG ne présente aucune activité protéolytique décelable dans les tests classiques d'évaluation (Xie *et al.*, 1991).

Chez les ovins, le dosage de la protéine associée de la gestation permet également d'établir un diagnostic précoce de la gravité (dès le 25<sup>e</sup> 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 (Ranilla *et al.* 1994 ; Weems *et al.* 1994).

L'existence de protéines associées à la gestation et faisant partie du groupe des protéases aspartiques apparaît commune aux différentes espèces de ruminants mais n'est pas strictement limitée à ceux-ci : des protéines similaires existent également chez le porc (Szafranska *et al.*, 1994) et chez le cheval (Green *et al.*, 1994). Par ailleurs, comme l'a précisé Sasser récemment, la PSPB mise en évidence par l'équipe américaine fait également partie de cette famille (Sasser, 1992).

*A propos de l'existence d'une hormone chorionique gonadotrope chez les ruminants : poursuite des recherches.*

Disposant des antisérums spécifiques et de la protéine chorionique gonadotrope bovine semi-purifiée, nous avons, toujours en collaboration avec le professeur Roberts, cherché à isoler et séquencer son cDNA. Les premiers essais de clonage moléculaire des ADNC par criblage, au moyen de sonde générée contre des séquences typiques des gonadotropines hypophysaires déjà connues telles que FSH, LH et hCG, se sont révélés infructueux et le séquençage de la partie N-terminale ne put être réalisé, faute de disposer d'une préparation purifiée parfaitement homogène.

En conséquence, les bibliothèques placentaires bovines furent tout d'abord criblées au moyen d'un cDNA de l'OPAG. Ensuite, le criblage immunologique au moyen d'un antisérum anti-bCG — développé au début de nos recherches sur la chorionique gonadotrope — a démontré la reconnaissance parfaite et intégrale de la protéine codée par ce gène (Xie *et al.*, 1994). Ainsi, la protéine isolée sur la base de son activité lutéotrope appartient également au groupe de protéases aspartiques ; elle est fortement apparentée à la PAG avec laquelle elle présente environ 58 % d'homologie.

Ainsi, la protéine — que nous avons appelée gonadotrope 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, nous restons dans l'incertitude : faut-il considérer la protéine à activité de type LH comme la gonadotrope chorionique bovine (bCG) ou faut-il au contraire la classer en fonction de son appartenance au groupe des protéases aspartiques et la considérer comme une simple « pregnancy associated glycoprotein n° II » (PAGII) ? Dans ce choix de terminologie, la littérature ne peut guère nous aider bien que certaines « sérines » protéinases 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 sérines protéinases tel le chymotrypsinogène et l'hCG humaine.

Pour notre part, des investigations nouvelles portant sur le maintien du corps jaune gestatif chez les ruminants, et sur la sécrétion de progestérone par le placenta, et surtout sur l'intervention des gonadotropines dans le maintien de ces fonctions, sont indispensables pour attribuer à la protéine chorionique gonadotrope bovine (bCG) ou protéine associée à la gestation n° II, un rôle lutéotrope déterminant, ou au contraire, pour ne lui conférer qu'une fonction secondaire dans ces régulations.

En résumé, le placenta des ruminants synthétise et sécrète plusieurs glycoprotéines de la famille des protéases aspartiques : PAGI, PAGII... Ces protéines se révèlent inactives sur le plan enzymatique bien que leur séquence en acides aminés soit hautement conservée. La PAGII quant à elle, initialement mise en évidence sous le nom de gonadotropine chorionique bovine (bCG) fait également partie de la famille mais possède en outre la capacité de se lier au récepteur à LH, et probablement de l'activer.

## RÉSUMÉ

Le placenta des ruminants a la particularité de démontrer l'existence de cellules trophoblastiques binucléées, sièges de synthèses protéiques importantes, et d'une capacité de migration et de fusion avec les cellules épithéliales de l'endomètre.

Parmi les molécules synthétisées par ces cellules, nos recherches viennent d'identifier deux glycoprotéines de la famille des protéases aspartiques, inactives sur le plan enzymatique : la « pregnancy associated glycoprotein I » et la « pregnancy associated glycoprotein II » (PAGI et PAGII).

La première (PAGI) est abondamment libérée dans le sang (compartiment) maternel, ce qui pourrait corroborer son inactivité sur le plan enzymatique.

La seconde (PAGII) n'est pas encore caractérisée entièrement mais sa propriété de liaison aux récepteurs à la lutropine (LH), avec une grande affinité, pourrait l'identifier à la molécule mise en évidence antérieurement sous le nom de : hormone chorionique gonadotrope bovine (bCG).

Une caractérisation plus complète de ces glycoprotéines (PAGI et PAGII) et de nouveaux membres éventuels (PAGIII...) devrait permettre de répondre à ces questions et plus particulièrement de fournir une explication au processus invasif du placenta.

## SUMMARY

The ruminant placenta contains binucleate trophoblastic cells synthesizing proteins, migrating cross the barrier and fusing with endothelial cells of the endometrium.

Recently described were two glycoproteins from the family of aspartic proteases, apparently lacking the enzymatic activity: the pregnancy associated glycoproteins I and II (PAGI and PAGII).

The first (PAGI) is largely secreted in maternal blood, this characteristic copes with the lack of proteolytic activity.

The second (PAGII) is not completely characterized. However, it binds to lutropin (LH) receptors with high affinity. This binding allows to assume that PAGII is likely the same as the bovine chorionic gonadotropin identified earlier (BCG).

A better characterization of these glycoproteins (PAGI and PAGII) and other members of the family (PAGIII...) will answer these questions together with the unexplained invasive process of the placenta.

## BIBLIOGRAPHIE

- AILENBERG M. & M. SHEMESI. *Biol. reprod.*, 28 : 517-522 (1983).  
 ASCHHEIM S. & B. ZONDEK. *Klin. Wschr.*, 7 : 1404-1411 (1928).  
 ASHETON R. *Phil. trans. R. Soc. B.*, 198 : 143-220 (1906).  
 BUTLER J. E., W. C. HAMILTON, R. G. SASSER, C. A. RUDER, G. M. HASS & R. J. WILLIAMS. *Biol. reprod.*, 26 : 925-933 (1982).  
 COLE H.H. & G. H. HART. *Am. j. Physiol.*, 93 : 57-68 (1930).  
 FOOTE W. C. & D. K. KAUSHIK. *J. anim. sci.*, 22 : 857-858 (1963).  
 FOSTER T. S. *Can. j. agr. sci.*, 36 : 463-470 (1956).  
 IMAKAWA K., R. V. ANTHONY, M. KAZEMI, K. R. MAROTTI, H. G. POLITES & R. M. ROBERTS. *Biol. reprod.*, 36, suppl. 1, 50 (1987).  
 IMAKAWA K., T. R. HANSEN, P. V. MALATHY, R. V. ANTHONY, H. G. POLITES, K. R. MAROTTI & R. M. ROBERTS. *Molec. Endocrinol.*, 3 : 127-139 (1989).  
 LUNNEN J. E. & W. C. FOOTE. *Endocrinology*, 81 : 61-66 (1967).  
 OXENDER W. D., H. D. HAFS & L. A. EDGERTON. *J. anim. sci.*, 35 : 51-55 (1972).  
 RANILLA M. J., J. SULON, M. D. CARRO, A. R. MANTECÓN & J. F. BECKERS. *Theriogenology*, 42 : 537-545 (1994).  
 ROBERTS R. M., S. XIE, R. J. NAGEL, B. LOW, J. GREEN & J. F. BECKERS. *Aspartyl proteinases*. In press.  
 SASSER R. G., C. A. RUDER, K. A. IVANI, J. E. BUTLER & W. C. HAMILTON. *Biol. reprod.*, 35 : 936-942 (1987).  
 SASSER R. G. International congress on animal reproduction, The Hague, The Netherlands, août 1992.  
 WARREN W. C., R. LIANG, G.G. KRIVI, N. R. SIEGEL & R. V. ANTHONY. *J. Endocrinol.*, 126 : 141-149 (1990).  
 WEEMS Y. S., R. G. SASSER, D. L. VINCENT, K. NUSSER, Y. TANAKA, K. LEDGERWOOD, K. MILLER-PATRICK & C. W. WEEMS. 27th annual meeting of the society for the study of reproduction, Ann Arbor, Michigan, July 24-27, 1994.

- WILLEY K. P. & F. LEIDENBERGER. *J. biol. Chem.*, 33 : 19716-19729 (1989).
- WIMSATT W. A. *Am. j. of Anatomy*, 89 : 233 (1951).
- XIE S., B. G. LOW, K.K. KRAMER, R. J. NAGEL, R. V. ANTONY, A. P. ZOLI, J. F. BECKERS & R. M. ROBERTS. *Proc. natl. Acad. Sci USA*, 88 : 10247-10251 (1991).
- XIE S., B. G. LOW, R. J. NAGEL, J. F. BECKERS & R. M. ROBERTS. *Biol. reprod.*, 51 : 1145-1153 (1994).
- ZOLI A. P., J. F. BECKERS, J. CLOSSET, P. BALLMAN-WOUTERS, P. FALMAGNE & F. ECTORS. *Biol. reprod.*, 45 : 1-10 (1991).
- ZOLI A. P., L. A. GUIBAULT, P. DELAHAUT, W. BENITEZ ORTIZ & J. F. BECKERS. *Biol. reprod.*, 46 : 83-92 (1992).

(Service de physiologie de la reproduction, Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège.)

### Discussion

*M. R. Lambotte.* — Je voudrais vous féliciter pour la qualité de votre lecture. Sans entrer dans le domaine biochimique qui est le vôtre, vous nous avez signalé l'existence chez les ruminants de « Schwangerschaftsproteins ». Celles-ci sont aussi présentes dans l'espèce humaine mais on ignore leur rôle. Pensez-vous qu'elles interviennent dans les phénomènes d'implantation, dans l'éventuelle tolérance immunologique locale ? J'aimerais connaître votre opinion.

*M. J. F. Beckers.* — Merci pour votre question. Effectivement, tout comme dans l'espèce humaine, nous venons d'identifier des « Schwangerschaftsproteins » chez les ruminants et plus particulièrement chez les bovins. Etant donné que nous les avons également retrouvées dans le testicule et plus précisément au niveau des cellules de Sertoli, nous avons préféré les nommer : « protéines associées à la gestation ».

Tout comme les « Schwangerschaftsproteins » humaines, ces protéines sont conjecturalement impliquées dans les processus de migration et fusion cellulaire typiques de l'implantation et dans la tolérance immunologique locale du placenta. Notre équipe n'a cependant encore entrepris aucune investigation systématique dans ces voies. Cet aspect devrait d'ailleurs être envisagé en collaboration avec les équipes compétentes en la matière.

*M. J. Content.* — Peut-on exclure une activité protéasique des PAG vis-à-vis d'un substrat protéique spécifique encore inconnu ?

— A-t-on essayé de mutagéniser une des PAG pour tenter d'augmenter son activité protéasique (sur la base des résultats de modélisation présentés) ?

— Trouve-t-on une homologie au niveau des séquences de DNA des différentes PAG entre elles et vis-à-vis d'autres hormones telles LH... ?

*M. J. F. Beckers.* — Non certainement pas, car à ce jour, l'activité protéasique n'a été évaluée que dans un seul modèle : celui de la protéolyse de l'hémoglobine alkylatée radioactive (C14).

De plus, il est impérieux d'utiliser une préparation de protéine (PAG) fraîche, non dénaturée (la lyophilisation pourrait en effet altérer ses qualités) dans le test, avant d'affirmer ou d'infirmer définitivement l'existence d'une activité protéasique sur tel ou tel substrat.

— Non, nous n'en sommes pas encore là... Les théories que je viens de vous présenter ont été élaborées par modélisation moléculaire dans un programme d'étude de protéines développé par le Dr J. Tang à Oklahoma City.

— Concernant les acides aminés, seule la séquence N-terminale de la PAGI a été déterminée expérimentalement. Cependant, à partir de cDNA séquencé complètement pour la PAGI et la PAGII, le niveau d'identité entre bPAGII et bPAGI ou oPAG est de 58 %. Par contre, on ne relève aucune similarité de séquence avec les sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$  des gonadotropines hypophysaires ou placentaires connues à ce jour, à savoir hCG, PMSG, FSH et LH des espèces dans lesquelles la séquence a été déterminée et se trouve enregistrée dans le Gen-Bank.

*M. J. Derivaux.* — Je félicite M. Beckers pour son intéressante communication et la clarté de son exposé. J'aimerais lui demander si la recherche et la mise en évidence de semblables protéines ont été faites, lors de gestation chez des espèces animales autres que les ruminants et, dans l'affirmative, quels sont les éléments reconnus ou estimés responsables de leur sécrétion. La fonction biologique de ces protéines est-elle aujourd'hui bien précise ?

*M. J. F. Beckers.* — Grand merci pour votre commentaire, j'y suis d'autant plus sensible que vous connaissez très bien cette recherche pour l'avoir suivie depuis le départ.

Oui, des protéines similaires existent également chez d'autres espèces en dehors des ruminants. L'équipe du professeur M. Roberts vient d'identifier les cDNA de protéines fortement apparentées à la PAGI chez le cheval et chez le porc. Mais, les connaissances sont encore faibles ; seuls des abstracts ont été publiés au cours du dernier congrès de la SSR (Society for the study of reproduction) qui s'est tenu en juillet 1994 à Ann Arbor, Michigan. Dans ces dernières espèces, on ne connaît pas encore exactement quelles sont les cellules sécrétrices ; on sait seulement à leur sujet qu'elles se situent au niveau du placenta et qu'elles correspondent aux cellules binucléées, trinuéclées ou syncitiales observées de façon générale. Enfin, la fonction biologique de ces protéines reste l'objet d'une question sans réponse, sauf, peut-être, en ce qui concerne la PAGII dont je vous ai entretenu aujourd'hui, et plus particulièrement en ce qui concerne sa liaison au récepteur LH et son action lutéotrope probable.

*M. J. J. Hoet.* — J'ai admiré la précision et la minutie dans vos approches expérimentales, M. Beckers.

Vous avez exploré à un certain stade deux races de bovidés et avez constaté des différences de taille entre mâles et femelles. Y avait-il une différence dans vos dosages de PAG en rapport avec le poids ou la taille à la naissance ou encore au cours de la période post-natale ?

*M. Beckers.* — Je vous remercie pour votre appréciation et pour votre question relative au taux de sécrétion en fonction de la taille ou du sexe des fœtus. En effet, cet aspect a été envisagé au cours de nos études ; malheureusement, les expériences n'avaient pas été conçues pour cette recherche bien précise. Cependant, à partir de plasma collecté chez des vaches ou des génisses de race Holstein ou Hereford, ayant reçu un embryon Holstein par transfert embryonnaire (expérience réalisée à Lennoxville au Québec), nous avons pu suivre les concentrations de PAG en fin de gestation et juste après la parturition. Des différences entre les niveaux moyens de concentration sont apparues entre les vaches ou génisses porteuses de fœtus mâle ou femelle ; cette différence apparaissait d'autant plus clairement que la distance phylogénétique entre la race du fœtus et celle de la mère porteuse était grande ; par exemple entre mère porteuse Hereford et fœtus Holstein. Cependant, aucune explication scientifique n'a pu être apportée à cette observation.

En ce qui concerne plus particulièrement le lien entre les concentrations de PAG et la taille des fœtus, il semble ne pas y avoir de relation bien

que, comme je vous l'ai dit, cette question n'a pas été envisagée de façon systématique. Par ailleurs, lors d'expériences similaires antérieures, au cours desquelles nous avons réalisé le dosage du « bovine placental lactogen » (bPL), nous avons observé une relation à la fois entre le poids du fœtus et la concentration de l'hormone chez la mère, également entre la concentration de l'hormone dans les semaines précédant la parturition et la quantité de lait produite dans les semaines suivant la parturition. Cette observation corroborait ainsi le rôle du « bovine placental lactogen » (bPL) en tant qu'hormone responsable de la croissance fœtale et préparant la glande mammaire à la lactation ultérieure.