

Endocrinologie de la Gestation chez les Ruminants: Les Protéines Placentaires*

ZARROUK A., REMY B., SULON J., DRION P.V., DESBULEUX H., BECKERS J.F.

Université de Liège – Faculté de Médecine Vétérinaire – Service de Physiologie de la Reproduction
Bd de Colonster 20, B41- B4000 Sart-Tilman (Belgium)

* Ce travail a été réalisé avec le soutien de l'IRSIA, du FNRS, du Ministère de l'Agriculture belge
et du Ministère de l'Enseignement Supérieur Tunisien

RESUME. Chez les ruminants, les protéines placentaires caractérisées à ce jour appartiennent à deux groupes: les hormones lactogènes et les protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation. Les hormones lactogènes placentaires font partie de la famille de la prolactine et de l'hormone de croissance et interviennent essentiellement dans la mammogénèse, la croissance fœtale et le métabolisme maternel. Quant aux protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation de découverte récente, elles constituent un champ nouveau d'investigations. Elles appartiennent à la famille des protéases aspartiques au même titre que la pepsine, la cathepsine D et la cathepsine E. Les hormones lactogènes placentaires et les protéines de la gestation sont synthétisées par les cellules binucléées du trophoctoderme qui, après fusion aux cellules utérines, les déversent dans la circulation maternelle. Les dosages radioimmunologiques de ces protéines dans le sérum des femelles gestantes ont permis d'établir leurs profils sécrétoires au cours de la gestation. Chez les différentes espèces de ruminants domestiques et sauvages, leur dosage est utilisé pour poser ou confirmer un diagnostic de gestation; par ailleurs, des investigations complémentaires portent sur la recherche d'une relation entre l'altération du profil sérique de ces protéines et la survenue d'un accident affectant l'évolution de la gestation: mortalité embryonnaire, avortement, détresse fœtale...

INTRODUCTION

Chez les mammifères supérieurs, le fœtus se développe dans l'utérus grâce au placenta. Cette structure spécialisée et unique peut se définir comme étant l'apposition et/ou la fusion de cellules épithéliales endométriales et trophoblastiques destinées à établir un contact étroit entre mère et fœtus. Ainsi le placenta représente une barrière anatomique entre les systèmes circulatoires de la mère et du fœtus: circulation utérine et circulation fœtale ne sont jamais en communication directe mais sont suffisamment contiguës pour que les éléments nutritifs passent du sang maternel au sang fœtal et que les déchets passent dans le sens opposé. Cependant, le placenta ne représente

pas un filtre purement passif et est au contraire doté d'une activité métabolique spécifique lui permettant d'assurer un transport actif et sélectif de substances nécessaires au développement du fœtus (Derivaux *et al.*, 1988). Outre sa fonction métabolique, le placenta exerce un rôle de barrière vis à vis de certaines molécules toxiques de poids moléculaire supérieur à 1000 Daltons. Il est de plus pourvu d'une fonction endocrine.

LES PLACENTAS

Du point de vue anatomique, l'enveloppe la plus externe de l'embryon ou chorion présente au niveau de sa face externe des villosités ou cotylé-

dons qui s'engrènent dans des formations spécialisées de la muqueuse utérine pour donner naissance aux placentomes, véritables surfaces d'attache utéro-placentaire. Les espaces inter-cotylédonnaires lisses forment le paraplacenta. L'ensemble des éléments, placentomes et paraplacenta, concourent à former le placenta.

Ce dernier se subdivise en diverses catégories en fonction de l'ampleur de la distribution des attaches utéro-choriales, à savoir:

- le placenta diffus rencontré chez la jument et la truie
- le placenta localisé dont les particularités varient suivant les espèces:

- placenta localisé cotylédonnaire chez les ruminants
- placenta localisé zonaire chez la chienne
- placenta localisé discoïde chez la lapine, la femme.

D'un point de vue histologique, la classification de Grosser (1909) distingue les placentas en fonction du nombre de couches séparant le sang maternel du sang fœtal:

- Les placentas épithélio-choriaux, chez la jument, la truie. Six couches histologiques sont interposées entre les deux circulations: l'endothélium chorial, le conjonctif chorial, l'épithélium chorial, l'épithélium utérin, le conjonctif utérin et l'endothélium capillaire.
- Les placentas syndesmo-choriaux chez les ruminants où l'épithélium utérin a disparu. L'épithélium chorial se trouve directement au contact du conjonctif utérin.
- Les placentas endothélio-choriaux caractéristiques des carnivores. Les constituants du chorion restent intacts tandis que le seul élément persistant de la muqueuse utérine est l'endothélium capillaire.
- Les placentas hémochoriaux retrouvés chez les primates et les rongeurs. Le sang maternel est en contact étroit avec les villosités du chorion.

Interface fœto-maternelle des ruminants

Chez les ruminants, l'interface fœto-maternelle est modifiée structurellement en fonction des espèces, en syncytium ou en cellules trinuéclées hybrides fœto-maternelles résultant de la migration et de la fusion de cellules binuéclées fœtales avec des cellules utérines.

Les cellules binuéclées proviennent de cellules du trophoctoderme ayant subi une division de noyau mais pas du cytoplasme et perdant le contact avec la membrane basale et les autres cellules (Wooding, 1992). Ces cellules sont riches en granules, constituant le lieu de synthèse et de stockage de stéroïdes (progestérone), d'hormones lactogènes placentaires

et d'autres protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation.

Les hormones lactogènes et les protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation sont déversées dans la circulation sanguine fœtale selon un mécanisme qui demeure inconnu et dans la circulation maternelle après la fusion des cellules fœtales aux cellules utérines. Ce processus est continu depuis l'implantation du conceptus (correspondant aux jours 16-18 après la conception chez la brebis, 18-20 chez la chèvre et 20-22 chez la vache) jusqu'à un ou deux jours avant la parturition, moment à partir duquel le nombre de cellules binuéclées diminue chez la brebis et la chèvre probablement sous l'action du cortisol (Wooding *et al.*, 1986).

Chez la vache, la fusion des cellules binuéclées aux cellules endothéliales utérines donne naissance à des cellules géantes de courte durée de vie. Les autres cellules utérines vont à leur tour fusionner avec les cellules binuéclées, former des cellules géantes puis dégénérer.

Les cycles de migration, fusion, dégénérescence se poursuivent tout au long de la gestation et constituent un

processus de renouvellement permanent de l'interface fœto-maternelle. Wooding (1992) propose le qualificatif de synépithéliochorial pour souligner le rôle essentiel de la fusion cellulaire dans la formation du tissu hybride d'origine fœto-maternelle. Ces processus vont de pair avec une fonction sécrétoire des cellules binuéclées (facteurs de croissance, de migration, de dégénérescence cellulaire; facteurs d'adhésion cellulaire et enzymes).

HORMONES LACTOGENES PLACENTAIRES ET PROTEINES SPECIFIQUES DE (OU ASSOCIEES A) LA GESTATION

Nous limiterons l'objet de cette synthèse bibliographique aux hormones lactogènes placentaires et aux protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation.

Les premières interviendraient dans les métabolismes glucidique, lipidique et azoté maternels, dans la croissance et le développement mammaire, conditionnant partiellement la production laitière ultérieure (Wooding et Flint, 1992).

Tableau 1 A
Protéines de la grossesse chez la femme et leurs caractéristiques (d'après Bohn, 1994)

Protéines de gestation	Noms et synonymes	Caractéristiques physico-chimiques		
		Mobilité électrophorétique	Poids moléculaire (en daltons)	Concentration en hydrates de carbone (%).
SP1	Pregnancy-Specific β 1-glycoprotein Pregnancy-associated plasma protein C (PAPP-C) Trophoblastic-specific β 1-globulin (TSG)	β 1 (α 2)	90.000 (200.000) (400.000)	29,3
SP2	Steroid-binding β -globulin (SBBG) Sex-hormone-binding globulin (SHBG)	β 1	65.000	12,6
SP3	Pregnancy-associated α 2-glycoprotein (α 2-PAG) Pregnancy-zone protein (PZ) Pregnancy-associated macroglobulin (PAM)	α 2	360.000	12,2
PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein A	α 2	750.000	19,2
PAPP-B	Pregnancy-associated plasma protein B	β 1	1.000.000	?
β 1-PAM	Pregnancy-associated β 1-macroglobulin	β 1	1.500.000	?
α 2-PAM	Pregnancy-associated α 2-macroglobulin	α 2	2.100.000	10

Les secondes sont classées en deux catégories selon leur présence exclusive chez les femelles gestantes ou retrouvées aussi bien chez les mâles que les femelles non gestantes. Dans le premier cas, elles sont dites spécifiques de la gestation (par exemple la PSPB: Pregnancy Specific Protein B), dans le second, elles sont dites associées à la gestation car leur existence n'est pas limitée à celle-ci. Ainsi, les protéines associées à la gestation voient leur concentration considérablement augmentée au cours de la gravidité.

D'une manière générale, les protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation sont glycosylées et ont été décrites dans un grand nombre d'espèces: primates (humain), ruminants domestiques (bovin, ovin et caprin) et sauvages (cerf, daim, bison), autres artiodactyles (cheval, zèbre et porc) et chez les carnivores (chat).

C'est dans l'espèce humaine que les protéines de la gestation ont été étudiées en premier lieu et qu'elles sont les plus nombreuses. Plus de quarante protéines ont été isolées et plus de vingt ont été caractérisées.

Tenant compte des caractéristiques biochimiques de ces protéines, Bohn en 1984 les classifie en trois catégories: les protéines de la gestation (Tableau 1A) les protéines placentaires solubles (Tableau 1B) et les protéines associées à la membrane placentaire (Tableau 1C). Toutefois dès 1984, Bohn pondère cette classification en démontrant que des protéines solubles du placenta sont sécrétées dans la circulation maternelle et voient leur concentration augmentée avec l'avancement de la gestation. Elles pourraient donc être utilisées en tant que marqueur spécifique de cet état (ex: la PP5).

Par ailleurs, d'autres protéines considérées au départ comme spécifiques de la gestation telles la SP1 ou PSG appartiennent en fait à la famille des antigènes carcino-embryonnaires. Elles devraient être considérées comme associées à la gestation car elles sont sécrétées par différents tissus ou organes: la moelle osseuse, l'intestin, l'utérus et les testicules (Létourneau et Beauchemin, 1997).

De même, chez les ruminants, la protéine spécifique de la gestation dénommée PSPB (Butler *et al.*, 1982) a été décrite comme strictement d'origine placentaire tandis que la PAG (Pregnancy Associated Glycoprotein) a été de plus retrouvée dans les gonades mâle et femelle (Zoli *et al.*, 1990 et Zoli *et al.*, 1991).

Les molécules sécrétées dans le sang maternel, peuvent faire l'objet de dosage dans le sérum ou le plasma. Dans certaines limites, l'interprétation des concentrations détectées peut permettre d'établir un diagnostic de gestation ou refléter une mortalité embryonnaire ou encore une détresse fœtale. A titre d'exemple, une étude récente a démontré chez la femme qu'une augmentation de la SP1 est observée en cas de trisomie 18 et 21 (Létourneau et Beauchemin, 1997).

Chez les ruminants, ce type de recherche est plus récent et les investigations portant sur l'endocrinologie de la gestation sont beaucoup moins fréquentes. Cependant, il est probable que les profils sécrétoires des protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation et des hormones lactogènes placentaires soient altérés

Tableau 1 B
Les protéines solubles du tissu placentaire humain et leurs caractéristiques (d'après Bohn, 1994)

Protéine placentaire	Nom ou fonction ou synonyme	Mobilité électrophorétique	Poids moléculaire (en daltons)	Concentration en hydrates de carbone (%)
PP1		$\alpha 1$	160.000	2,7
PP2	ferritine	$\alpha 2$	500.000	
PP3		$\alpha 2$	100.000	
PP4		$\alpha 2-\alpha 1$	35.000 ¹	2,4
PP5	Protease inhibitor	$\beta 1$	36.000 ²	19,8
PP6		$\alpha 1$	1.000.000 ²	6,6
PP7	Glutathione S-transferase	$\alpha 2-\beta 1$	37.000 ²	5,4
PP8		$\alpha 1$	45.000 ²	4,1
PP9		$\beta 1$	35.000 ²	5,6
PP10		$\alpha 1$	48.000 ²	6,6
PP11		$\alpha 1$	44.300 ²	3,9
PP12	CAG-1	$\alpha 1$	25.200 ²	4,3
PP13		albumin	30.000 ²	0,6
PP14	CAG-2	$\alpha 2-\alpha 1$	43.000 ²	17,5
PP15	Immunosuppressive	albumin	30.700 ²	3,3
PP16		albumin	46.000 ¹	4,1
PP17		$\alpha 2-\beta 1$	30.300 ²	2,1
PP18		$\beta 1$	82.300 ²	2,3
PP19		$\alpha 1-\beta 1$	36.000 ²	3,9
PP20		>albumin	52.100 ²	2,9
PP21		$\beta 1$	52.900 ²	19,2

¹. Déterminé par SDS-PAGE

². Déterminé par ultracentrifugation

Tableau 1 C
Les protéines associées à la membrane placentaire et leurs caractéristiques (d'après Bohn, 1994)

Protéines	Mobilité électrophorétique	poids moléculaire	Concentration en hydrates de carbone
MP2	$\alpha 2-\beta 1$	200000-1000000	-8%
MP3	$\beta 1$	>750000	-
MP4	$\beta 1-\beta 2$	-300000	-
MP5	$\alpha 1-\alpha 2$	-300000	+
MP6	$\beta 2$	-100000	+
MP7	$\alpha 2$	-100000	+

MP : membrane-associated protein

en cas de détresse ou de mort fœtale (Humblot *et al.*, 1992; Wallace *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1996).

Avant d'aborder l'étude des mortalités embryonnaires et avortements non infectieux dans l'espèce caprine, nous présentons une synthèse bibliographique sur les caractéristiques biochimiques et les profils sériques des hormones et protéines placentaires chez les trois espèces de ruminants domestiques: bovins, ovins et caprins.

Les hormones lactogènes placentaires

La première description d'une hormone placentaire à activité endocrine multiple remonte aux travaux de Selye (1933), qui dès le début, a montré chez la rate, le rôle non essentiel de l'hypophyse dans le maintien de la gestation et le déclenchement de la lactation.

En 1959, Contopoulos et Simpson suggèrent la présence dans le placenta d'une substance exerçant des propriétés somatotropes.

Dans l'espèce humaine, les premiers isolements d'une hormone à activité somatotrope et lactogène ont été réalisés par Fukushima (1961). Josimovich et Maclaren (1962) procédèrent à sa purification et lui attribuèrent le nom d'hormone placentaire lactogène. En 1968, Li *et al.* utilisent l'appellation d'hormone chorionique somatomammotrope pour bien rendre compte de l'activité bifonctionnelle de l'hormone. Par la suite, la dénomination d'hormone lactogène placentaire a été retenue (Gaspard, 1980). Chez les ruminants, la description d'une hormone placentaire lactogène n'a pu être faite qu'en 1972 par Buttle *et al.*

La présence d'hormones lactogènes et placentaires a été signalée dans plusieurs espèces. Ces molécules font partie de la famille de la prolactine et de l'hormone de croissance et présentent une similarité de séquence avec des variations interspécifiques.

Chez les bovins

La purification et la caractérisation de l'hormone lactogène placentaire bovine ont été réalisées par plusieurs

Tableau 2
Caractéristiques physico-chimiques des hormones lactogènes placentaires chez les ruminants (d'après Byatt *et al.*, 1994)

Espèces	Masse moléculaire par SDS-PAGE	Masse moléculaire à partir de la séquence primaire	pI ^a	Glycosylation
Bovine	31.000-34.000	22.968	4,8,6,3 ^b	Oui
Ovine	22.000-23.000	22.469	6,8,8,8,9,2 ^c	Non
Caprine	22.500	ND ^f	8,0,8,4 ^e	ND

a Point isoélectrique

b Byatt *et al.*, 1986

c Hurley *et al.*, 1977

d Chan *et al.*, 1967

e Warren *et al.*, 1990

f ND: non déterminé

g Currie *et al.*, 1990

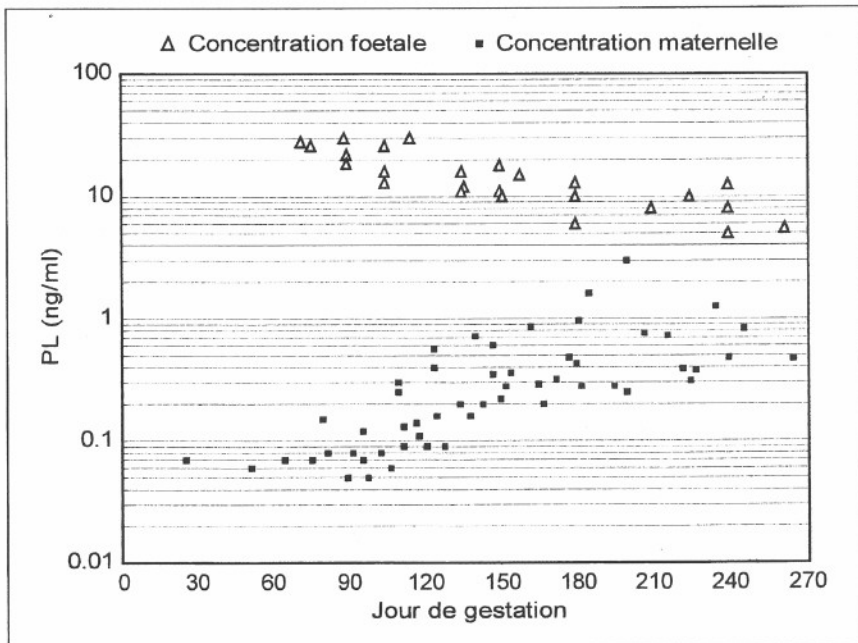


Figure 1

Profils plasmatiques de l'hormone lactogène placentaire chez la mère et le fœtus. A) Chez la vache (d'après Beckers *et al.*, 1982).

équipes (Beckers *et al.*, 1980; Murthy *et al.*, 1982 et Arima et Bremel, 1983). L'hormone possède plusieurs isoformes de masses moléculaires s'étalant de 30000 à 34000 Daltons (Tableau 2). Contrairement aux hormones lactogènes placentaires des autres espèces, l'hormone bovine apparaît comme fortement glycosylée (Shimomura et Bremel, 1988) ce qui se traduit par une masse moléculaire élevée avec imprécision de son estimation en électrophorèse dans des conditions dénaturantes.

Beckers *et al.* (1982), ont développé une méthode radioimmunologique (RIA) pour mesurer la concentration de l'hormone lactogène placentaire chez le fœtus. La concentration sé-

rique est de 25-30 ng/ml au 90^e jour après la fécondation et diminue graduellement pour atteindre 5 ng/ml aux alentours de la naissance (Fig 1).

L'hormone est dosable dans le sérum maternel entre le 26^e et le 110^e jour de gestation, date variable selon les femelles (Beckers *et al.*, 1982). Le taux sérique augmente ensuite pour atteindre des valeurs maximales quelques jours avant la parturition (Fig 1). Ces concentrations sériques de l'hormone lactogène placentaire restent toutefois 100 à 1.000 fois inférieures à celles des autres espèces étudiées (Bremel et Schuler, 1987).

Des expériences de transfert d'embryons ont montré que la concentra-

taire de l'hormone lactogène placentaire est fonction de la race et de la famille de l'embryon, ainsi que de la distance raciale ou familiale entre celui-ci et la mère adoptive (Guilbault *et al.*, 1988). La taille du fœtus et le poids du veau à la naissance influencent la concentration sérique de l'hormone lactogène placentaire. Cependant, la mesure des concentrations ne permet pas d'établir des prédictions sûres relatives à l'existence d'une gestation simple ou gémellaire (Patel *et al.*, 1996).

Les vaches présentant une mortalité embryonnaire précoce ou donnant naissance à des schistosomus reflexus ont un profil en hormone lactogène placentaire altéré. En conséquence, il apparaît que le profil de l'hormone chorionique somatomammotrope peut constituer un index de prédiction de la viabilité fœto-placentaire (Patel *et al.*, 1996).

Chez les ovins

L'hormone lactogène placentaire ovine a été purifiée par différents auteurs (Martal et Djiane, 1975; Chan *et al.*, 1976; Hurley *et al.*, 1977). Sa séquence en acides aminés a été déterminée dix ans plus tard par Colosi *et al.* (1989).

C'est une hormone non glycosylée de masse moléculaire de 22000 Daltons (Warren *et al.*, 1990) présentant 67% de similarité de séquence avec l'hormone lactogène placentaire bovine. Elle est plus proche de la prolactine (48%) que de l'hormone de croissance (27%) et est produite par les cellules binucléées et déversée dans les circulations maternelle et fœtale. Elle est détectée dès 16^e jour de gestation dans le tissu trophoblastique (Martal et Djiane *et al.*, 1977) alors qu'elle n'est détectable qu'au delà du 40^e jour dans le sérum maternel.

La concentration de l'hormone chorionique somatomammotrope est approximativement 9 fois plus élevée dans le sérum fœtal (137 ng/ml) que dans le sérum maternel (13 ng/ml) entre les jours 46 et 110 après la conception alors qu'au delà du 110^e jour, la concentration fœtale (58 ng/ml) est 5 fois plus faible (Fig 2) que la concentration maternelle (290 ng/ml) (Chan *et al.*, 1978).

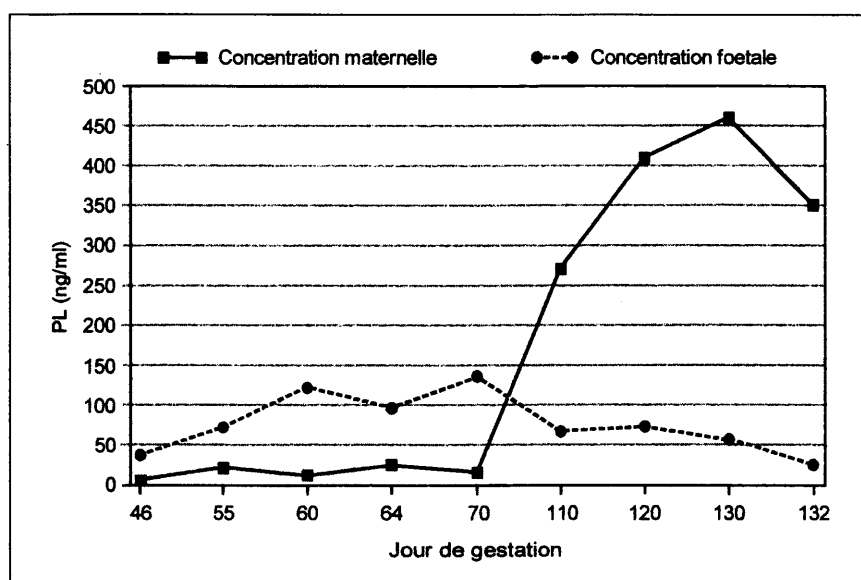


Figure 2
Profils plasmatiques de l'hormone lactogène placentaire chez la mère et le fœtus chez la brebis (d'après Chan *et al.*, 1981).

La concentration de l'hormone lactogène placentaire maternelle est corrélée positivement avec le poids du placenta et donc avec la taille de la portée (Taylor *et al.* 1980; Butler *et al.* 1981). Cependant, il n'y a pas de relation entre les concentrations fœtale et maternelle en hormone lactogène ce qui suggérerait un mécanisme de contrôle différent (Kappes *et al.* 1992).

La production laitière est positivement corrélée avec le nombre de fœtus présents dans l'utérus au cours de la gestation précédente. L'inhibition de la sécrétion de la prolactine hypophysaire induite par l'injection de l'ergocryptine n'affecte en rien le développement mammaire suggérant que l'hormone lactogène placentaire est capable à elle seule de soutenir une mammogénèse normale (Martal et Djiane, 1977). L'hormone lactogène placentaire possède également des propriétés lutéotropes qui se justifient surtout en début de gestation (MacLeod *et al.*, 1989): elle maintient les récepteurs à la LH au niveau des corps jaunes des rates pseudogestantes (Chan *et al.*, 1980) et inhibe la lutéolyse au niveau des ovaires de rates en phase lutéale (De La Llosa-Hermier *et al.*, 1983). L'hormone lactogène placentaire favorise enfin la croissance fœtale par l'intermédiaire des IGFs (Insulin Growth factor) (Anthony *et al.*, 1995). En effet, la perfusion d'IGF-I à des fœtus ovins favorise la

croissance des organes fœtaux, des glandes endocrines et du squelette (Lok *et al.*, 1996).

Chez les caprins

Bien qu'elle fut la première hormone apparentée à la famille de la prolactine et de l'hormone de croissance décrite chez les ruminants par Buttle *et al.* en 1972, elle fut moins bien caractérisée chez la chèvre que chez les autres espèces.

Différents auteurs comme Becka *et al.* (1977), Nugent *et al.* (1987), Chan *et al.* (1986) ont essayé de la purifier et n'y sont parvenus que partiellement. Ils ont en revanche développé des méthodes de dosage par *Radio Receptor Assay* (RRA) en utilisant les récepteurs à la prolactine et à l'hormone de croissance et les hormones hypophysaires purifiées en tant que traceurs. Ces techniques ont permis d'établir les profils sériques et un certain nombre de constatations concernant les propriétés biochimiques et métaboliques de cette hormone chez la chèvre.

Currie *et al.* (1990) ont purifié la protéine jusqu'à l'homogénéité et ont mis au point un système radioimmunologique pour le dosage de l'hormone dans le plasma et le sérum. L'hormone présente une masse moléculaire apparente de 22000 Daltons et un point isoélectrique de 8,35. Ces caractéristiques suggèrent fortement une non glycosylation de l'hormone,

à l'instar de celles retrouvées chez les humains et les ovins et à l'inverse de l'hormone bovine (Byatt *et al.*, 1992). La méthode de dosage permet de détecter l'hormone dans le sang maternel dès le 44^e jour suivant la fécondation (Currie *et al.*, 1992) et peut être utilisée comme diagnostic de gestation tardif à partir du 60^e jour de gestation avec 85% précision (Sardjana *et al.*, 1988).

Le taux de l'hormone lactogène placentaire (fig.3) augmente progressivement durant la gestation, atteint son maximum pendant la deuxième moitié de celle-ci puis décroît 36 heures avant la mise bas. L'hormone n'est plus détectable 18 heures après la parturition (Currie *et al.*, 1990), ce qui correspond à une demi-vie courte, cette caractéristique l'apparente à l'hormone lactogène placentaire bovine (Guilbault *et al.*, 1990). Tout comme chez les bovins et les ovins le taux d'hormone lactogène placentaire est fonction du développement du placenta et du poids total des fœtus (Hayden *et al.*, 1979).

L'hormone lactogène placentaire caprine a également un rôle important dans le développement et l'activité des glandes mammaires. L'augmentation de la sécrétion de l'hormone (entre les 10 et 16^e semaines de gestation) coïncide avec le développement lobulo-alvéolaire rapide de la glande mammaire et d'après Hayden *et al.* (1979), la production laitière

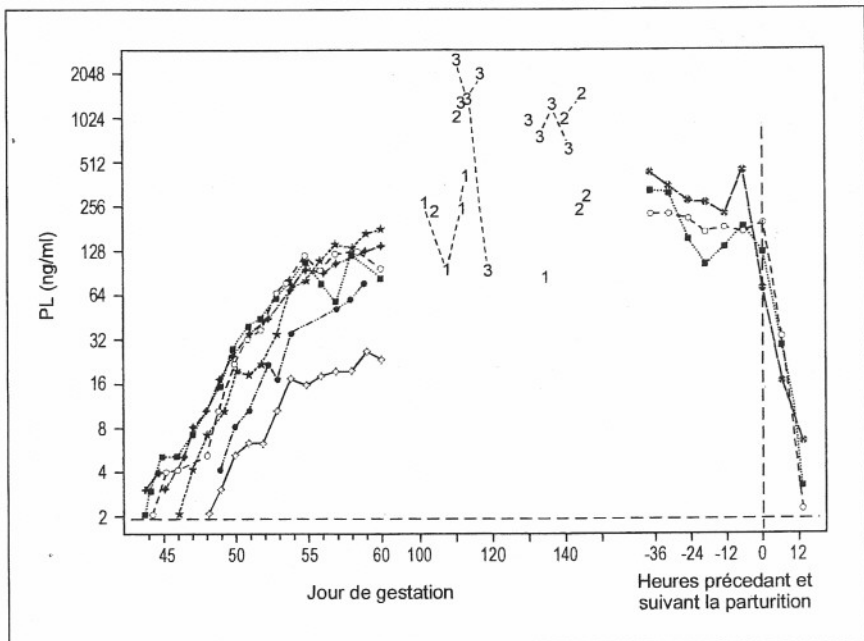


Figure 3

Profils plasmatiques de l'hormone lactogène placentaire caprine (d'après Currie *et al.*, 1990). 1, 2 et 3 correspondent au nombre de fœtus.

est corrélée avec la sécrétion de l'hormone entre la 11^e semaine et la mise bas. Par ailleurs, une corrélation négative a été décrite entre la concentration sérique de l'hormone lactogène placentaire et celle du glucose alors que les acides gras augmentent avec le taux de l'hormone (Hayden *et al.*, 1980).

Les protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation

Les protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation sont sécrétées dans le sang maternel dès le début de

la gestation. De ce fait, leur dosage peut être utilisé comme moyen précoce de diagnostic de gestation ou de mortalité embryonnaire. D'abord mises en évidence chez les différentes espèces de ruminants domestiques et sauvages, ces protéines se révèlent également être exprimées dans le placenta du porc, du cheval, du zèbre et du chat (Tableau 3).

Si la principale protéine de gestation humaine SP1 appartient à la superfamille des immunoglobulines (Létourneau et Beauchemin, 1997), des investigations par clonage molé-

Tableau 3
Les protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation identifiées à ce jour.

Famille	Espèce	Présence de Protéines gestation		Auteurs
		PAG	PSPB	
Bovidés	Bovine (<i>bos taurus</i>)	+	+	Butler <i>et al.</i> , 1982; Zoli <i>et al.</i> , 1991; Xie <i>et al.</i> , 1991 Xie <i>et al.</i> , 1991; Zoli <i>et al.</i> , 1995; Willard <i>et al.</i> , 1995 Humboldt <i>et al.</i> , 1990, 1992; Garbayo <i>et al.</i> , 1997
	Ovine (<i>ovis aries</i>)	+	+	
	Caprine (<i>capra hircus</i>)	+	+	
Cervidés	Cerf elaphe (<i>cervus elaphus nelsoni</i>)		+	Willard <i>et al.</i> , 1994 Willard <i>et al.</i> , 1994 Wood <i>et al.</i> , 1986 Osborn <i>et al.</i> , 1996; Wood <i>et al.</i> , 1986 Willard <i>et al.</i> , 1994 Haigh <i>et al.</i> , 1991
	Daim commun (<i>dama dama</i>)		+	
	Cerf mulet (<i>o. hemionus</i>)		+	
	Cerf de virginie (<i>o. virginianus</i>)	+	+	
	Cerf du japon (<i>cervus nippon</i>)		+	
	Bison des bois (<i>bison bison athbascae</i>)		+	
Equidés	Cheval (<i>equus caballus</i>)	+		Green <i>et al.</i> , 1994 Gan <i>et al.</i> , 1997
	Zèbre (<i>equus zebra</i>)	+		
Félidés	Chat (<i>felis domestica</i>)	+		Gan <i>et al.</i> , 1997
Suidés	Porc (<i>sus scrofa domesticus</i>)	+		Szafarska <i>et al.</i> , 1995

culaire et par séquençage nucléotidique ont permis de montrer que les protéines de la gestation chez les espèces citées ci-dessus font partie de la grande famille des protéases aspartiques. De multiples gènes codent pour ces molécules et ont été retrouvés chez différentes espèces: bovine, ovine et caprine (Xie *et al.*, 1995). Les protéines associées à la gestation constituent des membres actifs ou inactifs de la famille des protéases aspartiques probablement suivant qu'elles restent localisées au placenta ou qu'elles sont sécrétées abondamment.

Chez les bovins

En 1982, Butler *et al.* isolent et caractérisent à partir d'extraits placentaires deux protéines spécifiques de la gestation qu'ils appellent PSP-A et -B pour Pregnancy Specific Protein A et B. La PSP-A s'est révélée être l' α fœtoprotéine produite par le foie du fœtus alors que la PSPB est spécifique de la gestation. C'est une glycoprotéine acide de masse moléculaire apparente de 47000 à 53000 Daltons et présentant des variants isoélectriques (pI 4.0-4.4) (Sasser *et al.*, 1989). La masse moléculaire de cette protéine est du même ordre que celle de la molécule isolée par Laster (1977). Un dosage radioimmunologique dans le sérum de vaches gestantes a été développé par Sasser *et al.* (1986) permettant de réaliser un diagnostic de gestation précoce et précis.

La protéine peut être détectée dès le 24^e jour de gestation. Ensuite sa concentration dans le sang maternel

augmente au fur et à mesure que la gestation avance pour atteindre 150 ng/ml au 9^e mois. Le maximum (542 ng/ml) est atteint 2 jours avant la parturition. La concentration diminue par la suite pour être inférieure à 78 ng/ml trois semaines après le part et n'est plus dosable 100 jours après. La PSPB n'a pas été détectée chez les génisses non fécondées démontrant ainsi que cette protéine est induite par la gestation. La concentration sérique de la PSPB est plus élevée lors de gestation gémellaire. Ceci a été démontré dans des situations induites expérimentalement soit après transfert de demi-embryons (Dobson *et al.*, 1993) soit après transfert de deux embryons (Patel *et al.*, 1995).

Beckers *et al.* (1988) ont isolé deux protéines placentaires. La première a été caractérisée par Zoli (1991) et dénommée PAG1 pour Pregnancy Associated Glycoprotein parce qu'elle a été également retrouvée dans les gonades et qu'elle a été détectée chez les mâles et femelles non gestantes. La PAG1 est une glycoprotéine acide de masse moléculaire 67 kDa. Elle présente 4 isoformes de pI: 4.4, 4.6, 5.2 et 5.4. Des expériences par clonage moléculaire ont montré qu'une forme de 64 kDa de la PSPB est par sa structure primaire, apparentée à la PAG1 (Lynch *et al.*, 1992).

La seconde protéine possède de nombreux points communs avec la LH: liaison aux récepteurs du corps jaune, parenté immunologique et même comportement au cours de la purification. Cependant, cette pro-

téine n'a pas été purifiée jusqu'à l'homogénéité. Ultérieurement des études par clonage moléculaire ont permis de démontrer l'appartenance de cette protéine au groupe des protéases aspartiques au même titre que la PAG1 justifiant ainsi le nom de PAG2 (Xie *et al.*, 1994).

PAG1 et 2 présentent 58% de similarité de séquence. D'un point de vue immunologique, aucune réaction croisée n'est détectée. Le clonage moléculaire de leur acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire montre que les PAGs appartiennent à la famille des protéases aspartiques au même titre que la pepsine, la cathepsine D, la cathepsine E et la rénine. Ces enzymes sont protéolytiques à pH acide et agissent selon un mode catalytique faisant intervenir 2 résidus aspartyl du site actif de l'enzyme. Contrairement à la PAG2, la bPAG 1 présente des substitutions d'acides aminés au niveau du site actif la rendant enzymatiquement inactive (Xie *et al.*, 1994) (tableau 4). Un variant de la PAG-1 (PAG-1v) a été identifié par un antisérum anti-PAG1. Sa séquence nucléotidique est similaire à 91,5% avec celle de la PAG1 (Xie *et al.*, 1995).

PAG1 et 2 sont synthétisées par les cellules binucléées du placenta. En outre, la PAG2 est aussi synthétisée par les cellules mononucléées (Xie *et al.*, 1994) ce qui pourrait se traduire par une expression plus précoce au cours de la formation du placenta.

La PAG1 présente 4 formes isoélectriques acides et glycosylées: le pourcentage d'acide sialique varie

Tableau 4
Arbre phylogénique des PAGs apparentées aux protéases aspartiques construit suivant la méthode de Fitch et Margoliash (1967) (d'après Guruprasad K. *et al.*, 1996)

	Pepsine									
Pepsine	100	Chymosine								
Chymosine	59.5	100								
bPAG1	49.5	42.5	100							
bPAG1v	50.8	42.9	86.1	100						
bPAG2	50.8	45.6	57.8	58.8	100					
oPAG1	49.4	42.3	70.6	71.6	58.5	100				
oPAG2	50.5	45.9	60.4	60.2	63.4	60.4	100			
poPAG1	48.6	43.5	48.8	50.5	48.5	47.4	52.5	100		
poPAG2	52.9	44.3	56.2	55.1	56.7	54.2	57.4	61.8	100	
eqPAG	58.6	52.3	54.9	55.2	55.4	55.5	54.6	55.3	58.5	100

selon l'isoforme et modifie l'immuno-réactivité de la protéine. La forme basique est la plus active dans le dosage radioimmunologique (Zoli, 1991). La PAG1 est détectée dans le sang de certaines vaches à partir du 22^e jour après la conception et chez plus de 98% des vaches gestantes à partir du 30^e jour. La concentration sérique s'élève d'abord progressivement, puis plus rapidement pour atteindre des valeurs maximales de 2462 ng/ml 1 à 5 jours avant le vêlage (Fig 4). Après celui-ci, la concentration sérique de la bPAG1 décroît régulièrement et revient en dessous du seuil de détection (< 0,2 ng/ml) entre le 80^e et le 120^e jour *post partum* (Zoli, 1992). Jusqu'à ce jour, aucun dosage de la bPAG2 n'a été mis au point.

Des investigations sont actuellement en cours en vue de définir le rôle des protéines de la gestation. La PAG2 pourrait représenter un des facteurs lutéotropes du placenta des ruminants (Xie *et al.*, 1994). D'autre part, l'existence des PAGs et PSPB au niveau de l'interface fœto-maternelle suggère un rôle de ces protéines dans la tolérance maternelle de la gestation. Elles pourraient entrer en compétition avec le complexe majeur d'histocompatibilité pour la présentation de l'antigène aux cellules T (Roberts *et al.*, 1996).

Patel *et al.* (1995) montrent que le profil périphérique de la PSPB peut être utilisé pour fournir une indication sur la viabilité fœto-placentaire et le statut physique du fœtus. Les vaches portant des shistosomus reflexus ont une concentration altérée. Une chute brusque de PSPB en cours de gestation indique une mortalité fœtale.

Chez les ovins

Dès 1988, Zoli *et al.* ont entrepris des recherches sur l'isolement et la purification de protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation chez la brebis. La purification a produit une préparation hétérogène (Zoli *et al.*, 1990). Cette préparation a été injectée à des lapins et les antisérums générés ont permis le dosage de la PAG chez les petits ruminants et les cervidés.

Xie *et al.* (1991) ont entrepris des études visant à localiser les protéines

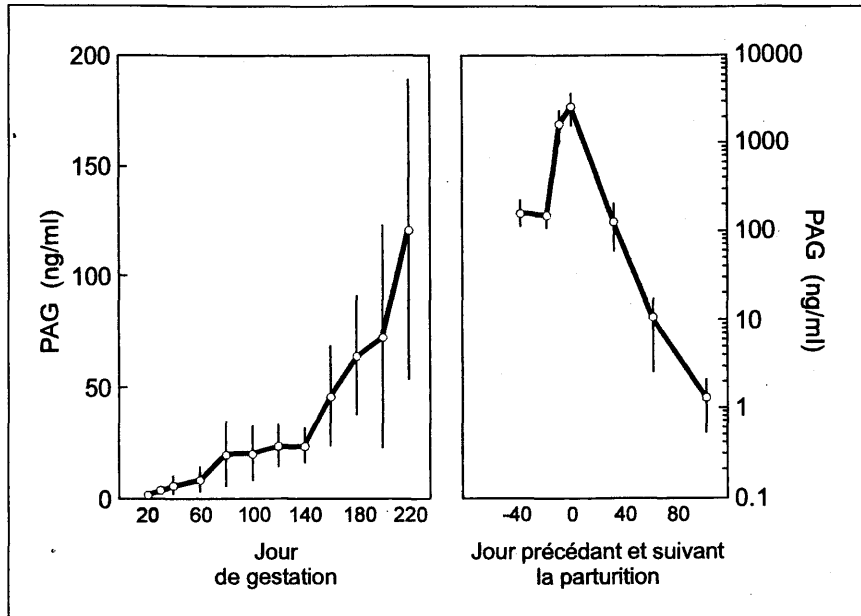


Figure 4 Profils plasmatiques de la PAG. A) (\pm SD) chez la vache (d'après Zoli *et al.*, 1992).

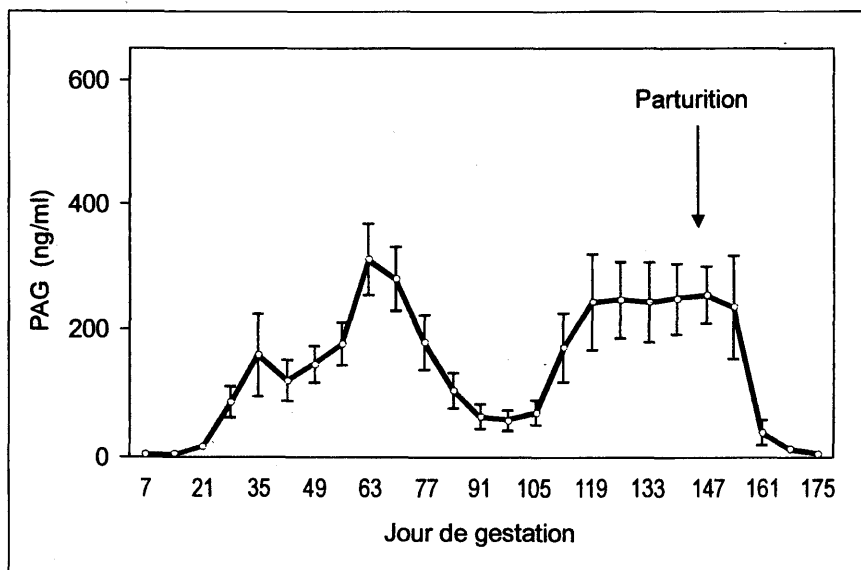


Figure 5 Profils plasmatiques de la PAG chez la brebis (\pm SEM) (d'après Ranilla *et al.*, 1994).

dans les tissus placentaires par immunohistochimie. Le marquage était limité aux cellules binucléées du trophoblaste et par immunoprécipitation l'antisérum reconnaissait un grand nombre de protéines de masse moléculaire variant de 47000 à 67000 Daltons. Le clonage moléculaire a permis d'identifier le gène d'une oPAG.

L'oPAG1 et la bPAG1 présentent 86% de similarité de séquence nucléotidique. L'oPAG-1 est enzymatiquement inactive tout comme la bPAG-1 (Xie *et al.*, 1991; Guruprasad *et al.*, 1996). Les protéines associées à la gestation ovines sont

synthétisées par les cellules binucléées à partir du 18^e jour après la conception et sont détectables à partir du 24^e jour dans la circulation sanguine maternelle. La concentration de ces protéines déterminée par un dosage hétérologue (utilisant la bPAG comme standard et traceur) n'augmente pas considérablement en fonction de l'évolution de la gestation contrairement à ce qui est observé chez les bovins.

Le profil des oPAGs est biphasique au cours de la gestation avec deux maximas (Fig 5). Comparé aux concentrations mesurées en *post partum* chez la vache, le taux des

protéines associées à la gestation de la brebis chute assez rapidement pour atteindre des valeurs basales dès la 4^e semaine après la parturition; la concentration de ces protéines associées à la gestation est fonction de la race, du sexe (Ranilla *et al.*, 1994) et du nombre de fœtus (Ranilla *et al.*, 1997). Les concentrations mesurées chez les brebis gestantes de fœtus mâles sont plus élevées que chez des brebis gestantes de fœtus femelles.

Une équipe américaine a réalisé la purification partielle de plusieurs formes de PSPB chez la brebis (Willard *et al.*, 1995). Les masses moléculaires des différentes formes sont de 43000, 59000 et 66000 Daltons. Selon Willard *et al.*, ceci pourrait s'expliquer par différents degrés de glycosylation et la forme de masse moléculaire 43000 serait probablement non glycosylée.

La PSPB est détectable à partir du 20^e jour après la conception. Elle est sécrétée par les cellules binucléées. Une relation temporelle existe, entre le moment de migration des cellules binucléées (qui débute au 18^e jour) et l'apparition de la PSPB dans le sang, ce qui suggère que la migration des cellules pourrait constituer un mécanisme primaire pour la libération de la PSPB.

Chez les ovins contrairement à ce qui est observé chez les bovins, la concentration de PSPB n'augmente pas avant la mise bas. Selon Willard *et al.* (1995), la structure du placenta serait à l'origine de cette différence. Chez la brebis, il a été observé une diminution du nombre des cellules binucléées avant la parturition (Wooding 1992) alors que chez la vache, il y a augmentation du nombre de cellules binucléées et du taux de cellules migrant vers l'épithélium utérin en fin de gestation. Les résultats de dosage de la PSPB montrent que le profil sérique de cette protéine est biphasique. Le premier pic correspondrait à la formation des cotylédons et à une phase rapide de croissance placentaire (30-75^e jour), le deuxième se produit durant le dernier trimestre quand la croissance rapide fœtale doit être assurée par une augmentation des échanges mère-fœtus.

L'augmentation de la PSPB sérique selon Willard *et al.*, serait seulement la conséquence d'une croissance fœtale et pourrait refléter une augmentation de la fonction endocrine ou du transport placentaire. Après l'agnelage, la PSPB décroît rapidement alors que chez la vache, la PSPB est détectable au 90^e jour après la parturition.

Il existe une relation directe entre la concentration sérique en PSPB et la masse placentaire totale et donc avec le nombre de fœtus (Willard *et al.*, 1995). Selon ces auteurs, des dosages répétés aux 60^e, 90^e et 120^e jour après la conception permettent de prédire avec 78% de fiabilité les femelles portant 1 ou plusieurs fœtus. De plus, les concentrations de PSPB sont fonction de la race des brebis, de la race des fœtus et de la combinaison des deux.

L'alimentation des brebis au cours de la gestation peut influencer le développement des produits de celle-ci. Un régime alimentaire hautement énergétique administré à des brebis de race Suffolk ou Dorset en début de gestation favorise la synthèse de tissus maternels (augmentation du poids des femelles) au détriment des tissus fœtaux. La masse du placenta et le poids du fœtus sont plus faibles que chez les fœtus provenant de mères ayant reçu un régime alimentaire normal (Wallace *et al.*, 1996). Le volume de colostrum est aussi moindre chez les brebis suralimentées. Selon les auteurs, le faible poids du placenta serait associé à un taux élevé d'avortement non infectieux et à l'origine d'une diminution de la synthèse hormonale placentaire incluant les hormones influençant le développement mammaire et en particulier l'hormone lactogène placentaire. A ce jour, aucune investigation n'a porté sur le dosage de cette hormone. Cependant en 1997, Wallace *et al.* répondent partiellement à cette question en dosant la PSPB autre protéine placentaire au cours de la gestation chez des brebis suralimentées. La concentration sérique de la PSPB chez ces dernières est inférieure à celle des brebis normalement alimentées, tout au long de la gestation et essentiellement entre le 50^e jour et le 100^e jour après la fécondation. La corrélation significa-

tive entre PSPB et la masse des fœtus chez les brebis avortant tardivement suggère que le dosage séquentiel de la PSPB en cours de gestation peut fournir une indication fiable sur la présence d'une détresse fœto-placentaire chez la brebis.

Chez les caprins

Dès 1990, Humblot *et al.* ont utilisé un dosage radioimmunologique hétérologue basé sur la liaison d'un traceur bovin et un antisérum anti PSPB ovine pour doser la protéine de la gestation chez la chèvre de race Alpine. Au 24^e jour après la fécondation, la concentration est de 1,78 ng/ml et augmente graduellement pour atteindre 3,37 au 26^e jour et 40 ng/ml aux jours 107-121.

De Sousa (1997) a réalisé les dosages de la protéine associée à la gestation et de la progestérone chez des chèvres de race Moxoto et Caninde. La PAG est détectable chez toutes les chèvres au 24^e jour après la fertilisation. La concentration de la PAG augmente rapidement de la 3^e à la 7^e semaine de gestation pour atteindre 123,84 ng/ml aux environs du 54^e jour lors d'une gestation simple et 168,75 ng/ml lors d'une gestation multiple. Sa concentration diminue ensuite pour se situer à la 9^e semaine à 45,45 ng/ml lors d'une gestation simple versus 101,59 lors d'une gestation gémellaire). Les concentrations ne subissent plus de variations significatives jusqu'à la parturition (fig 6).

Les recherches entreprises en vue de purifier les protéines associées à la gestation chez la chèvre viennent d'aboutir (Garbayo *et al.*, 1997) à l'isolement et à la caractérisation de trois formes de masse moléculaire de 55, 59 et 62 kDa et présentant des séquences peptidiques différentes. Chacune de ces formes présente à son tour plusieurs points isoélectriques probablement liés à des taux de glycosylation et de charge en acide sialique variables.

Comme chez la vache et chez la brebis, des études réalisées par dosage hétérologue sur des troupeaux de chèvres ont fait apparaître que les concentrations en PAG ou PSPB peuvent refléter une détresse fœtale ou placentaire. Ainsi en basant leurs

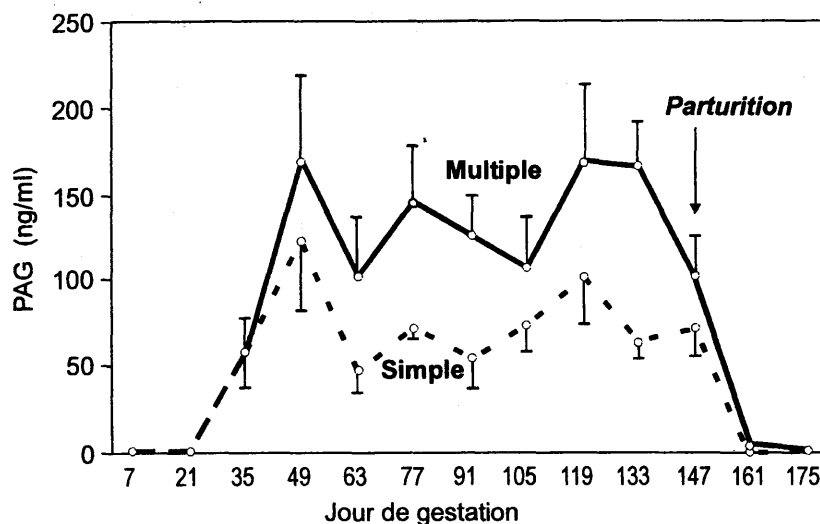


Figure 6

Profils plasmatiques de la PAG chez la chèvre (\pm SEM) lors de gestation simple et multiple (d'après De Souza, 1997).

restent au stade d'hypothèses; PAG ou PSPB entreraient en compétition avec les cellules présentatrices de l'antigène ou favoriseraient la tolérance de l'embryon par la mère grâce à un rôle immunosuppresseur, la PAG2 exercerait une fonction lutéotrope au cours de la gestation.

Actuellement, de nombreuses investigations visent à établir une relation entre les profils sériques des protéines de la gestation et la viabilité embryonnaire ou fœtale.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr J.M. Garbayo et M^{me} R. Noucaïri pour leur contribution à ce travail.

SUMMARY

Endocrinology of pregnancy in ruminants: the placental proteins

The two main groups of placental proteins of ruminants are related in this paper: Placental Lactogens and Pregnancy-Specific (-Associated) proteins. Placental lactogens belong to the prolactin and growth hormone family. They stimulate mammogenesis, fetal growth and maternal metabolism. Pregnancy-Specific proteins and Pregnancy-Associated glycoproteins belong to the aspartic proteinase family as pepsine, cathepsin D, E. These two groups of proteins are secreted in the maternal circulation by the binucleate cells after their migration to and fusion with the uterine cells. Their profiles were determined through RIA. Further investigations are in progress to rely secretory profiles with alterations of the trophoblastic function as occurring in embryonic mortality, abortion, fetal distress...

études sur le dosage hétérologue de la PSPB, Humblot *et al.* (1992) montrent que des concentrations faibles observées aux environs du 70^e jour de gestation sont associées à un taux élevé de mortalité fœtale.

CONCLUSION

Les hormones lactogènes placentaires et les protéines spécifiques de (ou associées à) la gestation constituent un domaine extrêmement riche de l'endocrinologie des ruminants. Leurs connaissances se sont fortement accrues pendant ces vingt dernières années.

Les premières appartiennent à la famille de l'hormone de croissance et de la prolactine. Ce sont des protéines glycosylées ou non, sécrétées par les cellules binucléées et détectables assez tardivement dans le sang maternel. Les hormones lactogènes interviennent dans la croissance fœtale *in utero* et dans la préparation de la mammogenèse conditionnant le niveau des productions colostrale et laitière suivantes. Quant aux protéines spécifiques de (ou associées

à) la gestation, durant ces quinze dernières années leurs caractéristiques biochimiques et biologiques se sont précisées: ces protéines sont glycosylées et présentent une longue demi-vie; les connaissances relatives à leur structure et leur séquence ont progressé considérablement montrant que ces protéines:

- appartiennent à la famille des protéases aspartiques (comme la pepsine, les cathepsines D et E et la rénine),
- sont sécrétées essentiellement par les cellules binucléées du trophoctoderme,
- présentent plusieurs isoformes produites simultanément par le placenta.

Leur niveau de sécrétion peut être influencé par la race, le nombre de fœtus présents dans l'utérus, le sexe du/des fœtus, par la distance, entre les races lorsque la gestation est issue de croisement ou de transfert embryonnaire, par les conditions environnementales des femelles gestantes... Bien que des études aient été entreprises pour préciser le rôle de ces protéines, les connaissances

BIBLIOGRAPHIE

- ANTHONY R.V., PRATT S.L., LIANG R., HOLLAND M.D. Placental-fetal hormonal interactions: Impact on fetal growth. *J.Anim.Sci.*, 1995, **73**, 1861-1871.
- ARIMA Y., BREMEL R.D. Purification and characterization of bovine Placental Lactogen. *Endocrinology*, 1983, **113**, 2186-2194.
- BECKA S., BILEK J., SLABA J., MIKULAS I. Some properties of the goat placental lactogen. *Experientia*, 1977, **33**, 771-772.
- BECKERS J.F. L'hormone placentaire somato-mammotrope bovine. Thèse d'agrégation, 1983.

- BECKERS J.F., DE COSTER R., WOUTERS-BALLMAN P., FROMONT-LIENARD Ch, VAN DER ZWALMEN P., ECTORS F. Dosage radioimmunologique de l'hormone placentaire somatotrope et mammatrope bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1982, **126**, 9-21.
- BECKERS J.F., DEWULF M., VERSTEGEN J., WOUTERS-BALLMAN P., ECTORS F. Isolation of a bovine chorionic gonadotrophin (bCG). *Theriogenology*, 1988, **29**, 218 (abstract).
- BECKERS J.F., FROMONT-LIENARD C., 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, **126**, 584-601.
- BOHN H. Biochemistry of placental proteins. In: *Proteins of the placenta*. 5th International Congress on Placental Proteins, Annecy 1984 Ed: Bischof P., Klopfer A.
- BREMEL R.D., SCHULER L.A. Bovine placental lactogen: structure and function. In: *The mammary gland: Development, Regulation and function* 1987. Ed: Margaret C. Neville, Charles W. Daniel.
- BUTLER J.E., HAMILTON W.C., SASSER R.G., RUDER C.A., HASS G.M., WILLIAMS R.J. Detection and partial characterization of two Bovine Pregnancy-Specific Proteins. *Biol. Reprod.*, 1982, **26**, 925-933.
- BUTLER W.R., FULLENKAMP S.M., CAPIELLO L.A., HANDWERGER S. The relation between breed and litter size in sheep and maternal serum concentrations of placental lactogen, estradiol and progesterone. *J. Anim. Sci.*, 1981, **53**, 1077-1081.
- BUTTLE H.L., FORSYTH I.A. Placental lactogen in the cow. *J. Endocrinol.*, 1976, **68**, 141-146.
- BUTTLE H.L., FORSYTH I.A., KNAGGS G.S. Plasma prolactin measured by radioimmunoassay and bioassay in pregnant and lactating goats and the occurrence of a placental lactogen. *J. Endocr.*, 1972, **53**, 483-491.
- BYATT J.C., BREMEL R.D. Lactogenic effect of bovine placental lactogen on pregnant rabbit but not pregnant heifer mammary gland explants. *J. Dairy Sci.*, 1986, **69**, 2066-2071.
- BYATT J.C., WARREN W.C., EPPARD P.J., STATEN N.R., KRIVI G.G., COLLIER R.J. Ruminant placental lactogens: Structure and biology. *J. anim. Sci.*, 1992, **70**, 2911-2923
- CHAN J.S.D., GRINWICH D.L., ROBERTSON H.A., FRIESEN H.G. Maintenance of receptors for luteinizing hormone by ovine placental lactogen in pseudopregnant rats. *Biol. Reprod.*, 1980, **23**, 60-63.
- CHAN J.S.D., NIE Z.R., SEIDAH N.G., CHRETIEN M. Purification and characterization of caprine placental lactogen (cPL). *Biol. Reprod.*, 1986, **34** (suppl. 1), 76 abstract.
- 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.
- CHAN J.S.D., ROBERTSON H.A., FRIESEN H.G. Purification and characterization of ovine placental lactogen. *Endocrinology*, 1976, **98**, 65-76.
- COLOSI P., THORDARSON, G., HELLMISS R., SING K., FORSYTH I.A., GLUCKMAN P., WOOD W.I. Cloning and expression of ovine placental lactogen. *Mol. Endocrinol.*, 1989, **3**, 1462-1469.
- CONTOPOULOS A.N., SIMPSON M.E. Growth promoting activity of pregnant rat plasma after hypophysectomy and after thyroidectomy. *Endocrinology*, 1959, **64**, 1023-1031.
- CURRIE W.B., CARD C.E., MICHEL F.J., IGNOTZ G. Purification, partial characterization, and development of a specific radioimmunoassay for goat placental lactogen. *J. Reprod. Fert.*, 1990, **90**, 25-36.
- CURRIE W.B., KELLY P.A., FRIESEN H.G., THORBURN G.D. Caprine placental lactogen: Levels of prolactin-like and growth hormone-like activities in the circulation of pregnant goats determined by radioreceptor assays. *J. Endocr.*, 1977, **73**, 215-226.
- DE LA LLOSA-HERMIER M.P., LBOULLEUX P., CHENE N., MARTAL J. Inhibitory effect of ovine and human placental lactogens on progesterone catabolism in luteinized rat ovaries in vitro. *Placenta*, 1983, **4**, 479-487.
- DERIVAUX J., ECTORS F., BECKERS J.F. Introduction. In: *Le placenta des ruminants: Structure et fonction endocrine* 1988.
- DE SOUZA NOELITA. Perfis serologicos de PAG (Pregnancy Associated Glycoprotein) E progesterona durante a gestação e periodo. Pós-Parto en cabras canindé et noxotó Pró-Reitoria de Pós-graduação e pes quisa. 1997. Faculdade de veterinária. Fortaleza, CE, Brésil.
- DOBSON H., ROWAN T.G., KIPPAX I.S., HUMBLLOT P. Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1993, **40**, 411-425.
- DUNBAR M.M., WONG T.S., RUDER-MONTGOMERY C.A., CHEW B.P., SASSER R.G. Partial characterization of the immunosuppressive properties of Pregnancy-Specific Protein B (PSPB). *Theriogenology*, 1990, **33** (suppl. 1), 220 (abstract).
- EAKLE K.A., ARIMAY., SWANSON P., GRIMEK H., BREMEL. R.D. A 32000-Molecular weight protein from bovine placenta with placental lactogen-like activity in radioreceptor assays. *The Endocrine Society*, 1982, **110**, 1758-1765.
- FUKUSHIMA M. Studies on somatotrophic hormone secretion in gynecology and obstetrics. *Tohoku J. Exper. Med.*, **74**, 161-174.
- GAN X., XIE S., GREEN J., ROBERTS R.M. Identification of transcripts for pregnancy associated glycoprotein (PAG) in carnivora and perissodactyla. *Biology of reproduction*, 1997, **56**, abstract 431.
- 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. submitted in Biol.Reprod.
- GASPARD U. Sécrétion de l'hormone lactogène placentaire (hPL) in vivo. In: *Les hormones protéiques placentaires*. Ed: Masson.
- GREEN J., XIE S., NEWMAN A., SZAFRANSKA B., ROBERTS R.M., BAKER C.B., McDOWELL K. Pregnancy-associated glycoproteins of the horse. *Biol. Reprod.*, 1994, **50** (suppl. 1), 152 (abstract).
- GROSSER O. Vergleichende anatomie und entwicklungsgeschichte der eihaut und der placenta. W. Braumüller, Vienna and leipzig 1909.
- GUILBAULT L.A., BECKERS J.F., ROY G.L. GRASSO F. Plasma concentrations of bovine placental lactogen, prolactin and prostaglandins during the periparturient period in Ayrshire heifers bearing different breeds of foetus. *Theriogenology*, 1988, **29** (1), 255 (abstract)
- GUILBAULT L.A., ROY G.L., BECKERS J.F., DOFOUR J.J. Influence of breed of fetus on preparturient endocrine responses and subsequent milk production of Ayrshire dams. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 2766-2773.
- GURUPRASAD K., BLUNDELL T.L., XIE S., GREEN J., SZAFRANSKA B., NAGEL R.J., McDOWELL K., BEN BAKER C., ROBERTS R.M. Comparative modelling and analysis of amino acid substitutions suggests that the family of pregnancy-associated glycoproteins includes both active and inactive aspartic proteinases. *Protein Engineering*, 1996, **9**, 849-856.
- HAIH J.C., GATES C., RUDER A., SASSER R. Diagnosis of pregnancy in wood bison using a bovine assay for Pregnancy-Specific Protein B. *Theriogenology*, 1991, **36**, 749-754.
- HAYDEN T.J., THOMAS C.R., FORSYTH I.A. Effect of number of young born (litter size) on milk yield of goats: Role for placental lactogen. *J. Dairy Sci.*, 1979, **62**, 53-57.
- HAYDEN T.J., THOMAS C.R., SMITH S.V., FORSYTH I.A. Placental lactogen in the goat in relation to stage of gestation, number of fetuses, metabolites, progesterone and time of day. *J. Endocr.*, 1980, **86**, 279-290.
- HUMBLLOT P., COURTIN H., JEANGUYOT N., THIBIER M., SASSER R.G. Pregnancy specific protein B and oestrone sulfate concentrations during pregnancy and embryonic mortality in dairy goats. 12th International congress on animal reproduction. The Hague, Netherlands. August 23-27, 1992, 2.

- HUMBLLOT P., DE MONTIGNY G., JEANGUYOT N., TETEDOIE F., PAYEN B., THIBIER M., SASSER R.G. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in french alpine goats throughout gestation. *J.Reprod.Fert.*, 1990, **89**, 205-212.
- HURLEY T.W., HANDWERGER S., FELLOWS R.E. Isolation and structural characterization of ovine placental lactogen. *Biochemistry*, 1977, **16**, 5598-5604.
- HURLEY T.W., HANDWERGER S., FELLOWS R.E. Isolation and structural characterization of ovine Placental Lactogen. *Biochemistry*, 1977, **16**, 5598-5604.
- JOSIMOVICH J.B., MacLAREN J.A. Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology*, 1962, **71**, 209-220.
- KAPPE S.M., WARREN W.C., PRATT S.L., LIANG R., ANTHONY R.V. Quantification and cellular localization of ovine placental lactogen messenger ribonucleic acid expression during mid- and late gestation. *Endocr.*, 1992, **131**, 2829-2838.
- LASTER D.B. A pregnancy-specific protein in the bovine uterus. *Biology of Reproduction*, 1977, **16**, 682-690.
- LETOURNEAU S., BEAUCHEMIN N. Rôles des antigènes carcino-embryonnaires dans la cancérisation et la progression tumorale. *Médecine et sciences*, 1997, **13**, 483-491
- LI C.H., GRUMBACH M.M., KAPLAN S.L., JOSIMOVICH J.B., FRIESEN H., CATT K.J. Human chorionic somatomammotropin (hCS), proposed terminology for designation of a placental hormone. *Experientia*, 1968, **24**, 1288.
- LOK F., OWENS J.A., MUNDY L., ROBINSON J.S., OWENS P.C. Insulin-like factor I promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *Am.J. Physiol.*, 1996, **270** (5 Pt 2) R 1148-55.
- LYNCH R.A., ALEXANDER B.M., SASSER R.G. The cloning and expression of the Bovine Pregnancy specific Protein B. *Biol. Reprod.* 1992, **46** (suppl. 1), 73.
- MacLEOD K.R., SMITH W.C., OGREN L., TALAMENTES F. Recombinant mouse placental lactogen-I binds to lactogen receptors in mouse liver and ovary: partial characterization of the ovarian receptor. *Endocr.*, 1989, **125**, 2258-2266.
- MARTAL J., DJIANE J. Mammothropic and growth promoting activities of a placental hormone in sheep. *J. of steroid. Biochemistry*, 1977, **8**, 415-417.
- MARTAL J., DJIANE J. Purification of a lactogenic hormone in sheep placenta. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 1975, **65**, 770-778.
- MELO DE SOUSA N. Perfis sorologicos de PAG (pregnancy-associated glycoprotein) e progesterona durante a gestação e periodo pos-parto em cabras canindé e moxoto. Pro-reitoria de pos-graduação e pesquisa. Faculdade de veterinaria. Brasil.
- MURTHY G.S., SCHELLENBERG C., FRIESEN H.G. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *Endocrinology*, 1982, **111**, 2117-2124.
- NUGENT P.F., HAYDEN T.J. The purification and preliminary characterization of caprine placental lactogen. *J. Endocrinol.*, 1987, **115** (suppl.):56 (abstract).
- OSBORN D.A., BECKERS J.F., SULON J., GASSET J.W., MULLER L.I., MURPHY B.P., MILLER K.V., MARCHINTON R.L. Use of glycoprotein assays for pregnancy diagnosis in white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.*, 1996, **60**, 388-393.
- PATEL O.V., DOMEKI I., SASAKI N., TAKAHASHI T., HIRAKO M., SASSER R.G., HUMBLLOT P. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on Pregnancy-Specific Protein B concentrations in the bovine. *Theriogenology*, 1995, **44**, 827-833.
- PATEL O.V., HIRAKO M., TAKAHASHI T., SASAKI N., DOMEKI I. Plasma bovine placental lactogen concentration throughout pregnancy in the cow; relationship to stage of pregnancy, fetal mass, number and postpartum milk yield. *Domestic Anim. Endocr.*, 1996, **13**, 351-359.
- RANILLA M.J., SULON J., CARRO M.D., MANTECON A.R., BECKERS J.F. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation churra and merino sheep. *Theriogenology*, 1994, **42**, 537-545.
- RANILLA M.J., SULON J., MANTECON A.R., BECKERS J.F., CARRO M.D. Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Ruminant Res.*, 1997, **24**, 125-131.
- ROBERTS R.M., XIE S., MATHIALAGAN N. Maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 1996, **54**, 294-302.
- SARDJANA I.K.W., TAINTURIER D., DJIANE J. Etude de l'hormone chorionique somatomammotrophique dans le plasma et le lactosérum au cours de la gestation et du post-partum chez la chèvre (application au diagnostic tardif de gestation). *Revue Méd. Vét.*, 1988, **139**, 1045-1052.
- SASSER R.G., RUDER C.A., IVANI K.A., BUTLER J.E., HAMILTON W.C. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel Pregnancy-Specific Protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.*, 1986, **35**, 936-942.
- SASSER R.G., CROCK J., RUDER-MONTGOMERY C.A. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J.Reprod.Fert.*, 1989, **37**, 109-113.
- SCHIMOMURA K., BREMEL R.D. Characterization of bovine placental lactogen as a glycoprotein with N-linked and O-linked carbohydrate side chains. *Mol.Endocrinol.*, 1988, **2**, 845-853.
- SCHULER L.A., SCHIMOMURA K., KESSLER M.A., ZIELER C.G., BREMEL R.D. Bovine placental lactogen: Molecular cloning and protein structure. *Biochemistry*, 1988, **27**, 8443-8448.
- SELYE H., COLLIP J.B., THOMSON D.L. The effect of hypophysectomy upon pregnancy and lactation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1933, **30**, 589.
- SZAFRANSKA B., XIE S., GREEN J., ROBERTS R.M. Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new member of the aspartic proteinase gene family expressed in trophectoderm. *Biol. Reprod.*, 1995, **53**, 21-28.
- TAYLOR M.J., JENKINS G., ROBINSON J.S., THORBURN G.D., FRIESEN H., CHAN J.S.D. Concentrations of placental lactogen in chronically catheterized ewes and fetuses in late pregnancy. *J.Endocrinol.*, 1980, **85**, 27-34.
- WALLACE J.M., AITKEN R.P., CHEYNE M.A. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J. Reprod. fert.*, 1996, **107**, 183-190.
- WALLACE J.M., AITKEN R.P., CHEYNE M.A., HUMBLLOT P. Pregnancy-Specific Protein B and progesterone concentrations in relation to nutritional regimen, placental mass and pregnancy outcome in growing adolescent ewes carrying singleton fetuses. *J. Reprod. fert.*, 1997, **109**, 53-58.
- WARREN W.C., KEISLER D.H., ANTHONY R.V. Synthesis and secretion of ovine placental lactogen and its biochemical properties. *Domestic Animal Endocrinology*, 1990, **7**, 331-342.
- WARREN W.C., LIANG R., KRIVI G.G., SIEGEL N.R., ANTHONY R.V. Purification and structural characterization of ovine placental lactogen. *J. of Endocr.*, 1990a, **126**, 141-149.
- WATHES D.C., WOODING F.B.P. An electron microscopic study of implantation in the cow. *Am.J. of Anat.*, 1980, **159**, 285-306.
- WILLARD J.M., WHITE D.R., WESSON C.A.R., STELLFLUG J., SASSER R.G. Detection of fetal twins in sheep using radioimmunoassay for pregnancy-specific protein B. *J. Anim. Sci.*, 1995, **73**, 960-966.
- WILLARD S.T., SASSER R.G., BRINGANS M., HUGHES D.M., WELSH T.H. Jr, JAKUES J.T., RANDEL R.D. Methods for pregnancy detection in sika deer (*cervus nippon*). *J.Anim.Sci.*, 1994, **72**, Abstract 1309.
- WILLARD S.T., SASSER R.G., GILLESPIE J.C., JAKUES J.T., WELSH T.H. Jr, RANDEL R.D. Methods for pregnancy determination and the effects of body condition on pregnancy status in rocky mountain elk (*cervus elephus nelsoni*). *Theriogenology*, 1994, **42**, 1095-1102.
- WILLARD S.T., SASSER R.G., GILLESPIE J.C., JAKUES J.T., WELSH T.H. Jr, RANDEL R.D. Early pregnancy detection and embryonic mortality in fallow deer (*Dama dama*). *J.Anim.Sci.*, 1994, **72**, Abstract 67.

- WOOD A.K., SHORT R.E., DARLING A.-E., DUSEK G.L., SASSER R.G., RUDER C.A. Serum assays for detecting pregnancy in mule and white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.*, 1986, **50**, 684-687.
- WOODING F.B.P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusion and hormone production. *Placenta*, 1992, **13**, 101-113.
- WOODING F.B.P., FLINT A.P.F., HEAP R.B., MORGAN G., BUTTLE H.L., YOUNG I.R. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. *J. Reprod. Fert.*, 1986, **76**, 499-512.
- WOODING F.B.P., WATHES D.C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fert.*, 1980, **59**, 425-430.
- WOODING F.B.P., FLINT A.P.F. Placentation. In: Marshall's physiology of reproduction 1992. Ed: G.E. Lamming.
- XIE S., GREEN J., BECKERS J.F., ROBERTS R.M. The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene*, 1995, **159**, 193-197.
- 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. *Biol. Reprod.*, 1994, **51**, 1145-1153.
- 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.*, 1991, **88**, 10247-10251.
- ZOLI A.P. Isolement, purification et caractérisation d'une protéine placentaire associée à la gestation chez les bovins. Thèse de doctorat, 1992, Université de Liège.
- ZOLI A.P., BECKERS J.F., ECTORS F. Isolement et caractérisation partielle d'une glycoprotéine associée à la gestation chez la brebis. *Ann. Méd. Vét.*, 1995, **139**, 177-184.
- ZOLI A.P., BECKERS J.F., WOUTERS-BALLMANN., CLOSSET J., FALMAGNE P., ECTORS F. Purification and characterization of a Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 1991, **45**, 1-10.
- ZOLI A.P., DEMEZ P., BECKERS J.F., REZNIK M., BECKERS A. Light and microscopic immunolocalization of Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in the bovine placentome. *Biol. Reprod.*, 1992, **46**, 623-629.
- ZOLI A.P., ECTORS F., BECKERS J.F. Ruminant gonads as accessory sources of pregnancy specific protein. The endocrine society 72nd Animal Meeting Atlanta, GA, June 20-23, 1990
- ZOLI A.P., BECKERS J.F., ECTORS F. Isolation of an ovine pregnancy-specific protein. *Theriogenology*, 1990, **33** (1), 366 abstract.