

Isolement et caractérisation partielle d'une glycoprotéine associée à la gestation chez la brebis*

A. P. ZOLI¹, J.F. BECKERS et F. ECTORS

Service de Physiologie et de Pathologie de la Reproduction
Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège
Bd de Colonster 20, P. 71 B. 41.
B — 4000 Liège 1. Belgique

* Travail réalisé grâce au soutien financier du Centre Universitaire de Dschang (Cameroun), de l'A.G.C.D. et de l'I.R.S.I.A. (Belgique).

¹Boursier A.G.C.D.

Manuscrit déposé le 14/11/1994.

INTRODUCTION

Chez les ruminants, le placenta est de type localisé cotylédonnaire et l'une de ses caractéristiques principales est la présence des cellules binucléées (Wimsatt, 1951; Amoroso, 1952). Ces dernières sont des cellules trophoblastiques dont la mitose nucléaire n'est pas suivie de division cytoplasmique. Les cellules à deux noyaux qui en résultent sont très actives et ont la propriété de migrer vers l'épithélium utérin d'où elles libèrent leurs produits de sécrétion dans la circulation maternelle (Amoroso, 1952; Wooding et al., 1980a; Wooding et al., 1980b; Wooding et al., 1981).

Quelques-uns des produits de sécrétion placentaire de nature protéique sont connus: l'hormone placentaire lactogène (PL) chez la vache (Bolander et al., 1978; Beckers et al., 1980), la brebis (Chan et al., 1978)

et la chèvre (Currie et al. 1990); la gonadotrophine chorionique (CG) (Lacroix et Martal, 1979; Ailenberg et Shemesh, 1983; Beckers et al., 1988), la protéine spécifique B de la gestation (PSPB) et la glycoprotéine associée à la gestation isolées chez la vache (Butler et al., 1982; Sasser et al. 1986; Camous et al., 1988, Zoli et al., 1991). Une protéine homologue de la PSPB a été mise en évidence dans le sang de brebis gestantes (Ruder et al., 1988; Camous et al., 1991), de chèvre domestique (Humblot et al., 1990) et de nombreux ruminants sauvages tels que le daim, la chèvre sauvage (Sasser et al., 1986), et le bison (Haigh et al., 1991).

Dans cette étude nous décrivons l'isolement, à partir des cotylédons fœtaux ovins, d'une glycoprotéine associée à la gestation mise en évidence dans le sérum de brebis ges-

RESUME

Des techniques de séparation séquentielle complémentaire de purification des protéines et l'usage d'un dosage radioimmunologique hétérologue ont permis l'isolement, à partir des cotylédons fœtaux ovins, d'une glycoprotéine associée à la gestation, l'oPAG: ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein. D'une masse moléculaire comprise entre 43.000 et 67.000, l'oPAG est une protéine apparemment hétérogène constituée de 382 acides aminés et présente une grande homologie (86 %) avec la PAG bovine et les protéines de la famille des protéases aspartiques ($\geq 50\%$). Elle serait cependant dépourvue de toute activité enzymatique, probablement à cause de la substitution d'un des deux acides aspartiques du site actif par la glycine. Synthétisée par les cellules binucléées trophoblastiques dès le 18^e jour post conceptionnel, l'oPAG est détectée dans la circulation sanguine maternelle à partir du 24^e jour de gestation.

tante grâce à des réactifs hétérologues (Zoli et al., 1990). Elle a été ensuite partiellement caractérisée. Il s'agit une glycoprotéine hétérogène dont les masses moléculaires et les séquences nucléotidique et en acides aminés ont été déterminés. Elle présente une grande homologie avec la glycoprotéine bovine associée à la gestation (bPAG) que nous avons antérieurement isolée et purifiée à partir des cotylédons fœtaux bovins (Zoli et al. 1991); ce qui a justifié la dénomination de «ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein (oPAG)». Les deux protéines, oPAG et bPAG, présentent également une homologie avec les protéines de la famille des protéases aspartiques (Xie et al., 1991).

MATERIEL ET METHODES

Collecte des cotylédons

Des utérus gravides de brebis ont été collectés à l'abattoir environ 20 min après l'abattage. Au laboratoire, les cotylédons fœtaux furent immédiatement et soigneusement disséqués; ensuite lavés avec une solution physiologique (0,9 % de NaCl), et conservés à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation.

Production des premiers antisérums

Préparation des immunogènes

Un demi-kilogramme de cotylédons était décongelé, broyé et homogénéisé dans du tampon phosphate de potassium (KH_2PO_4 0,01 M; pH 7,6). La préparation a été ensuite laissée sous légère agitation pendant 16 h. à 4°C, puis centrifugée à 27.000 x g pendant 1 h. Les protéines du surnageant ont été fractionnées au sulfate d'ammonium comme décrit ailleurs (Zoli et al., 1991). La fraction 40-80 % fut retenue; dialysée contre du tampon bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3 0,005 M, pH 8), puis lyophilisée; elle a servi d'antigène pour l'immunisation des lapins.

Immunisation des lapins

Quatre lapins adultes de 3 à 4 kg ont été immunisés selon la méthode décrite par Vaitukaitis et al. (1971) modifiée par Butler et al. (1982). Chaque animal a

reçu à la première injection 50 mg de lyophilisat reconstitué dans 2 ml d'eau bidistillée et émulsifié dans un volume équivalent d'adjuvant complet de Freund (Difco, Detroit, MI). Les injections intradermiques, ont été réalisées en 20 à 30 points au niveau du dos préalablement rasé. Les rappels ont été effectués tous les 15 jours avec la même quantité d'antigène émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund. Les lapins ont été saignés à partir de la 7e semaine après la première injection et les sérums recueillis étaient stockés à la température de -20°C jusqu'au moment de l'emploi.

Isolement de la protéine

Pendant tout le processus d'isolement, la protéine recherchée (oPAG) a été suivie grâce au test d'Ouchterlony (1949) amélioré par Hartmann et Toilliez (1957) et à un dosage radioimmunologique (RIA) hétérologue. En effet le traceur et le standard de la «bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein» (bPAG) (Zoli et al., 1992a) ont été utilisés. Les différentes étapes de l'isolement ont été réalisées à la température de 4°C.

Extraction et fractionnements au sulfate d'ammonium

Des cotylédons fœtaux (un demi-kilogramme) étaient décongelés, broyés et homogénéisés au mixer dans du tampon phosphate (KH_2PO_4 0,01 M; pH 7,6) additionné de 2 % d'EDTA. Le mélange était ensuite laissé sous légère agitation pendant 16 h puis centrifugé à 27.000 x g pendant 1 h. et le culot éliminé. Les protéines du surnageant ont été fractionnées au sulfate d'ammonium. Le précipité 40-80 % était retenu, resolubilisé dans 0,250 l de tampon Tris-HCl 0,01 M (pH 7,6) et abondamment dialysé contre le même tampon.

Chromatographies

1. Chromatographie sur échangeur d'anions: la DEAE cellulose

Après dialyse, la solution a été centrifugée à 36.000 x g pendant 10 min et le surnageant était soumis à une chromatographie sur échangeur d'anions, la diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE-DE 52 Whatman Inc; Clifton, NJ). La colonne de DEAE avait été préalablement équilibrée avec du tampon Tris- HCl (0,01 M, pH 7,6). Après élution de la fraction non adsorbée avec le même tampon, les protéines adsorbées ont été éluées par fractions avec des tampons de forces ioniques croissantes (0,02; 0,04; 0,08;

0,1; 0,2 M NaCl). La présence de l'oPAG était contrôlée dans chaque fraction par le test d'Ouchterlony et un RIA hétérologue. Les fractions hautement immunoréactives ont été dialysées contre du tampon phosphate (KH_2PO_4 0,01; pH 5,5) puis mélangées et concentrées.

2. Chromatographie sur échangeur de cations (SP C50).

La solution obtenue ci-dessus a été chargée sur une colonne de Sulphopropyl Sephadex C50 préalablement équilibrée en tampon phosphate 0,01 M (pH 5,5). Après élution de la fraction non adsorbée avec le même tampon, un gradient de force ionique croissante (0-1 M NaCl) est appliqué pour éluer les protéines adsorbées. Les fractions immunoréactives sont mélangées, dialysées et concentrées.

3. Chromatographie par filtration sur gel

Une chromatographie par filtration sur gel Sephadex G75 a été réalisée sur une colonne de 1,6 x 100 cm (Pharmacia, Upsala, Suède) équilibrée en tampon bicarbonate d'ammonium 0,01 M (pH8). Des échantillons (4 ml maximum) de la fraction de purification sur SP Sephadex C50 ont été chargés par colonne et les protéines éluées avec le même tampon. Des fractions de 4 ml ont été collectées et celles qui se sont révélées très immunoréactives ont été mélangées et lyophilisées. Elles ont été soumises au test de la double immunodiffusion radiale contre les différents antisérums ovins produits, les antisérums dirigés contre la glycoprotéine bovine associée à la gestation (bPAG), les hormones gonadotrope et placentaire lactogène bovines (bGH et bPL), l'albumine sérique ovine et bovine (OSA et BSA) et l'alphafœtoprotéine (AFP).

4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur mono S.

Dix milligrammes de protéines lyophilisées issues de la filtration sur Sephadex G75 furent solubilisées dans du tampon acétate d'ammonium 0,01 M (pH 5) et chargées sur une colonne pré-garnie de mono S (5 mm x 5 cm, Pharmacia, Upsala, Suède), préalablement équilibrée avec le même tampon. Après élution de la fraction non adsorbée, un gradient (0-1 M NaCl) était appliqué avec un débit de 0,5 ml/min afin d'éluer les protéines retenues. Des fractions de 1 ml ont été collectées. La présence de l'oPAG a été détectée par RIA, les fractions les plus immunoréactives ont été mélangées et

dialysées contre du tampon bicarbonate d'ammonium 0,005 M, (pH 8), puis lyophilisées.

Détermination de la masse moléculaire par électrophorèse

L'homogénéité et la masse moléculaire du produit final issu de la chromatographie sur mono S ont été déterminées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Phastgel, Pharmacia, Upsala, Suède) en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et d'un agent réducteur: le β -mercaptoéthanol. Après la phase de séparation, le gel fut coloré avec du Bleu de Coomassie R250. La masse moléculaire a été déterminée par comparaison avec un standard de masses moléculaires (Amersham) constitué de la phosphorilase b (94.000), de l'albumine sérique bovine (67.000), de l'ovalbumine (43.000), de l'anhydrase carbonique (30.000), du soyabean trypsin inhibitor (20.100) et de l' α -lactalbumine (14.400).

D'autre part, des pièces ($\approx 1 \text{ mm}^3$) de tissu placentaire ovin furent lavées (3 x) dans du milieu essentiel minimal de Dulbecco (MEMD) L-méthionine-free, puis incubées à 37°C dans le même milieu sous 5 % de CO_2 et 95 % d'air et contenant 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-(^{35}S) — méthionine (1151,4 Ci/mmol; DuPont/NEN). Le tissu et le milieu de culture furent ensuite séparés par centrifugation. Le milieu de culture ainsi obtenu a incubé avec du sérum préimmun de lapin (5 μl) et les complexes immuns formés ont été adsorbés sur protéine-A Sépharose CL-4B

et ensuite collectés par centrifugation. Le surnageant fut mis à incuber à 4°C pendant une nuit avec 1,5 μl d'antisérum anti-oPAG. Les immunocomplexes ont été adsorbés sur protéine-A Sépharose CL-4B pendant 2 h, puis lavés (3 x) dans du tampon NET-gel (50 mM Tris Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % de Nonidet P-40; 1 mM EDTA, pH 8; 0,25 % de gélatine; 0,02 % d'azide de sodium) et enfin analysés par SDS-PAGE (Xie et al. 1991).

Détermination de la séquence en acides aminés de l'oPAG

Matériels et Technique

Le séquençage de la protéine a été réalisé en collaboration avec le Professeur R. M. Roberts (Université du Missouri, Columbia, USA) qui nous autorise à reprendre ici les grandes lignes de sa méthode.

Des conceptus ovins ont été collectés par voie chirurgicale avant et après l'implantation (Godking et al., 1982; Warren et al., 1990) respectivement entre les 13e et 21e jours et au 100e jour après la conception. A partir des conceptus âgés de 15 jours, des banques des cDNA isolés sur vecteur $\lambda\text{gt}11$ ont été constituées selon la méthode de Imakawa et al. (1987, 1989) et criblées avec l'antisérum anti-oPAG produit chez le lapin par immunisation contre le produit de purification par HPLC sur mono S (Zoli et al., 1990). Les cDNA ont été sous-séquencés puis séquencés dans les deux directions au moyen des didéoxyribonu-

cléotides. Les banques des cDNA des tissus cotylédonnaires ovins (J. 100), constituées sur vecteur $\lambda\text{ZAP II}$ (Stratagene, La Jolla, CA) à partir de l'ARN polyadénylé (Warren et al., 1990) ont été criblées avec les cDNA isolés des banques des conceptus et marqués au ^{32}P . Les clones marqués par la sonde puis purifiés ont été transformés en phagémides par le bactériophage $\lambda\text{ZAP II}$ selon les procédures d'excision *in vivo* (Short et al., 1988). Les clones ont été ensuite séquencés.

RESULTATS

Chromatographies

Les fractions de protéines éluées sur DEAE-cellulose avec les tampons Tris-HCl de force ionique 0,02; 0,04; 0,08 et 0,1M de NaCl étaient immunoréactives. Cependant le taux d'immunoréactivité le plus élevé était observé dans les fractions 0,04 et 0,08 M NaCl. Dans la figure 1 le dosage radioimmunologique hétérologue indique que l'oPAG était éluée principalement dans les fractions 160 à 180 du gradient. Par filtration sur gel Sephadex G75, cette protéine était éluée dans le premier des pics obtenus. La purification par HPLC sur une colonne pré-garnie de mono S a donné un pic majoritaire (Fig. 2) dont les fractions, hautement immunoréactives, ont été mélangées.

Détermination de la masse moléculaire et la séquence en acides aminés.

Le produit issu de la chromatographie sur mono S (Fig. 3A, piste 1) était relativement homogène et correspondait à une masse moléculaire comprise entre 43.000 et 67.000. L'antisérum généré contre cette fraction a été utilisé pour précipiter les produits synthétisés et excrétés par les explants de tissu placentaire ovin.

La Fig. 3B montre les résultats de l'analyse, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, des sécrétions des trophoblastes ovins âgés de 25 jours et après culture des explants en présence de la L-(^{35}S) méthionine. L'antisérum a clairement reconnu 3 bandes de protéines dont les masses

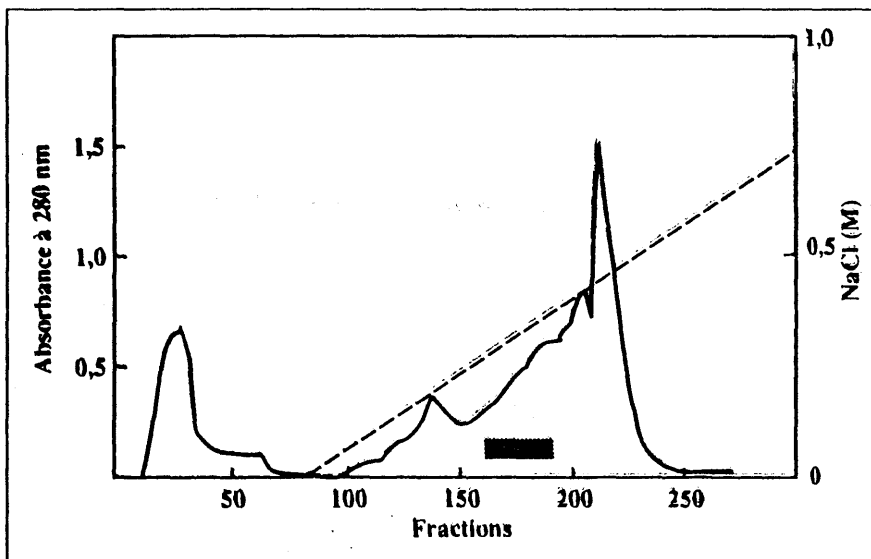


Figure 1
Profil d'éluion des protéines sur une colonne de Sulphopropyl C₃₀ (Pharmacia).
Le rectangle grisâtre représente la zone d'éluion de l'oPAG,
et la ligne discontinue le gradient de NaCl (0-1 M).

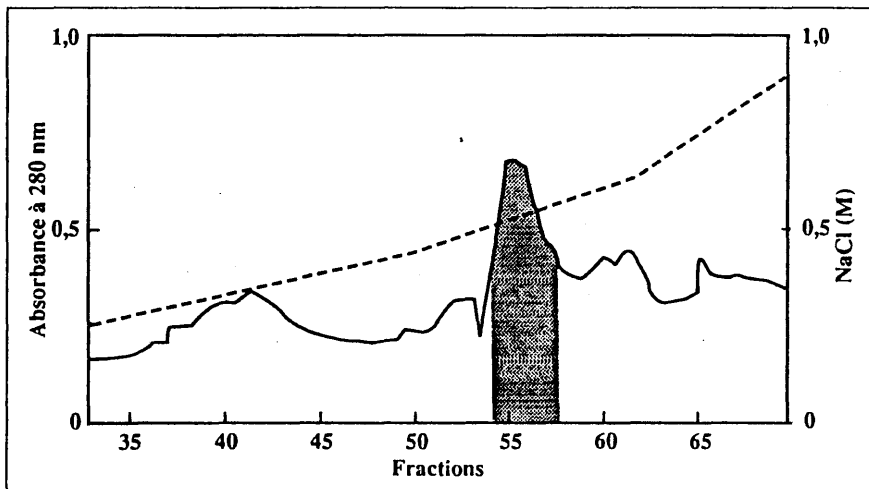


Figure 2

Profil d'élution de l'oPAG sur une colonne de mono S. Le grisé représente les fractions immunoréactives, et la ligne discontinue le gradient de NaCl (0-1 M).

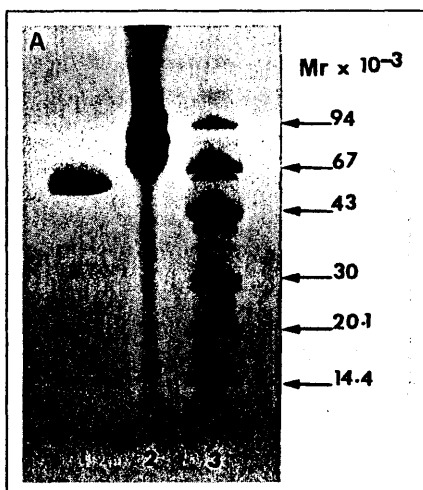


Figure 3A

Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) sur le produit final issu de la chromatographie sur mono S (piste 1). La piste 2 représente l'albumine sérique ovine (oSA).

moléculaires ont été estimées à 67.000, 53.000 et 47.000. La protéine de 67.000 était la plus précoce et prédominait en début de culture; mais avec le temps, la protéine de 47.000 apparaissait et devenait, quantitativement, de plus en plus importante.

Le séquençage de la protéine a permis d'isoler un clone complet constitué de 1266 paires de base (pb) consistant en un segment non traduit, à l'extrémité 5', de 20 pb; une phase ouverte de lecture de 1146 pb et une extrémité 3' de 100 pb. Le cDNA (op201) code donc pour un polypeptide long de 382 acides

aminés (Fig. 4) et possède 4 sites potentiels de N-glycosylation (acides aminés 42,59, 113 et 335).

DISCUSSION

Grâce à des techniques complémentaires de séparation, au test de double immunodiffusion radiale et à un dosage radioimmunologique hétérologue, une glycoprotéine associée à la gestation a été isolée des cotylédons foetaux ovins et partiellement caractérisée. La double immunodiffusion et la masse moléculaire estimée par SDS-PAGE (43.000 à 67.000) indiquent que la protéine isolée est distincte de l'albumine sérique ovine (oSA), de l'alphafoetoprotéine (AFP), de l'hormone placentaire lactogène ovine (oPL) (Warren et al., 1990), de la trophoblastine (oTP1) (Godking et al., 1982) et de certains antigènes mis en évidence aussi bien dans les sécrétions utérines (Cerini et al., 1976) que dans le sérum des brebis gestantes (Staples et al., 1980). La bande de la Fig. 3A (piste 1) serait en réalité constituée de trois bandes distinctes que la résolution du gel utilisé n'aurait pas pu séparer. En effet trois formes distinctes de oPAG de masses moléculaires égales à 67.000, 53.000 et 47.000, toutes reconnues par l'antisérum anti-oPAG, ont été mises en évidence dans le milieu de culture ainsi que dans des extraits tissulaires des trophoblastes provenant de blastocystes ovins âgés

de 25 jours (Xie et al., 1991; Xie et Naggel, 1993). Toutefois la forme de masse moléculaire égale à 67.000 semble d'apparition plus précoce (Fig. 3 B). Elle serait le précurseur des formes plus légères (Xie et Naggel, 1993). Des études de marquages métaboliques destinées à suivre l'interconversion des différentes formes d'oPAG ont montré que la forme de 67.000 apparaît la première dans le milieu de culture, puis la forme de 53.000 et enfin s'accumule la forme de 47.000 (Xie et Naggel, 1993).

L'obtention d'une protéine semi-purifiée (Fig. 3 A) a permis la production d'un antisérum suffisamment spécifique qui a servi au développement d'un dosage radioimmunologique et à la détection du mRNA au niveau des cellules binucléées trophoblastiques (Xie et al., 1991). Ce qui signifie que celles-ci constituent, comme pour la bPAG (Zoli et al., 1992b), le lieu de synthèse de la protéine. L'oPAG est mise en évidence dans les trophoblastes dès le 18e jour p.c. (Xie et al., 1991) et l'on peut la détecter dans le sérum de certaines brebis gestantes à partir du 24e jour de gestation (Zoli, 1992c).

La séquence en acides aminés de l'oPAG immature est constituée de 382 acides aminés. Les 15 premiers acides aminés semblent constituer la séquence signal avec un noyau d'acides aminés hydrophobes et de petits résidus neutres en positions -3

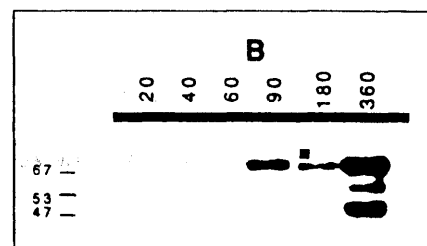


Figure 3B*

Biosynthèse, in vitro, de l'oPAG par des explants de placenta ovine en fonction du temps d'incubation indiqué (en min) au dessus des pistes. Un conceptus ovine est prélevé sur une brebis gestante de 25 jours et le tissu trophoblastique mis en culture. Les immunocomplexes obtenus à partir du milieu de culture ont été analysés par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide contenant 10 % de SDS.

* Avec l'autorisation du Professeur R. Michael ROBERTS de l'Université du Missouri-Columbia.

10 20 30 40 50 60
 CTTGGAGCCAGGAAAGAAG ATG AAG TGG CTT GTG CTC CTT GGG CTG GTG GCC TTC TCA GAA
 Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Gly

↓
 70 80 90 100 110 120
 TGC ATA GTG AAA ATA CCT CTA AGG AGA GTG AAG ACC ATG AGA AAC ACC CTC AGT GGA AAA
 Cys Ile Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Asn Thr Leu Ser Gly Lys

130 140 150 160 170 180
 AAG ATG CTG AAC AGT TTC CTG AAG GAA CAT GCT TAC AGA CTG TCT CAG ATT TCT TTT CGT
 Lys Met Leu Asn Ser Phe Leu Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Ser Phe Arg

* 200 210 220 230 240 *
 GCC TCA AAT CTG ACT ATT CAC CCT CTG AGA AAC ATT ATG GAT ATG CTC TAC GTG GGT AAC
 Ala Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg Asn Ileu Met Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn

250 260 270 280 290 300
 ATC ACC ATT GGA ACA CCC CCT CAG GAA TTC CAG GTT GTC TTT GAC ACA GGC TCA TCT GAC
 Ile Thr Ile Gly Thr Pro Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp

310 320 330 340 350 360
 TTG TTG GTG CCC TCC ATC AAT TGC CTC AGC CCA ACC AAG AGA CCC TGT AGT AAA CAA GAT
 Leu Leu val Pro Ser Ile Asn Cys Leu Ser Pro Thr Lys Arg Pro Cys Ser Lys Gln Asp

370 380 390 400 * 410 420
 AAG TTC AAA CAT CAC CAG TCT TCC ACC TTC CGG TTT ACC AAT GAC ACC TTC AGA ATC TAC
 Lys Phe Lys His His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Phe Thr Asn Asp Thr Phe Arg Ile Tyr

430 440 450 460 470 480
 TTT GGT TCT GGA ACA ATG AGA GGA TTT GTT GCT CAT GAC ACA GTT CGG ATT GGG GAC CTT
 Phe Gly Ser Gly Thr Met Arg Gly Phe Val Ala His Asp Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu

490 500 510 520 530 540
 GTA AGT ACT GAC CAG CCG TTT GGT CTA ATC TTT TTG GAA TCC TGG CTT GAT ATC CCT TTT
 Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ile Phe Leu Gly Ser Trp Leu Asp Ile Pro Phe

550 560 570 580 590 600
 GAT GGC ATC TTG GGC TTG AAC TAT CCC AAA ATA TCC TTC TCT GGA GCC ATC CCC ATC TTT
 Asp Gly Ile Leu Gly Leu Asn Tyr Pro Lys Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe

610 620 630 640 650 660
 GAC AAG CTG AAG AAT GAA GGT GCC TTT TCT GAG CCT GTT TTT GCC TTC TAC TTG AAC AAA
 Asp Lys Leu Lys Asn Gly Gly Ala Phe Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Asn Lys

670 680 690 700 710 720
 GAC AAG CAG GAG GGC AGT GTG GTG ATG TTT GGT GGG GTA GAC CAC CGC TAC TAC AAG
 GGA
 Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly

730 740 750 760 770 780
 GAG CTC AAC TGG GTA CCA TTG ATC CAC CCG GGC GAG TGG AGT ATA CCC TTG GAC CGC ATC
 Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile His Pro Gly Glu Trp Ser Ile Pro Leu Asp Arg Ile

790 800 810 820 830 840
 TCC ATG AGA AGA AAG GTT ATT GCT TGT TCT GGT GGC TGT GAG GCC CTT GTG GGC ACC GGG
 Ser Met Arg Arg Lys Val Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Glu Ala Leu Val Gly Thr Gly

850 860 870 880 890 900
 ACA TCA CTG ATC CTT GGC CCA AGA ACA GTG GTT GAA AAC ATA CAG AAG CAC ATC GGT GCC
 Thr Ser leu Ile Leu Gly Pro Arg Thr Val Val Glu Asn Ile Gln Lys His Ile Gly Ala

910 920 930 940 950 960
 ACA CAA CAG TGT TTC GAG TAC TTT GTT TCA TGT TCT GCG GTC TAT GCC CTG CCC TCT ATT
 Thr Gln Gln Cys Phe Glu Tyr Phe Val Ser Cys Ser Ala Val Tyr Ala Leu Pro Ser Ile

970 980 990 1000 1010 1020
 GTC TTC ACC ATC AAC GGC ATC AAC TAC CCA GTG CCA CCT CAA GCC TAC CTC GTC AAG GAT
 Val Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn Tyr Pro Val Pro Pro Gln Ala Tyr Leu Val Lys Asp

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TCT AGA GGC CAG TGC TAT TCC CCC TTT CAA GTG AAC AGA GCG AAT CCA TCT GCA GAG AAC
 Ser Arg Gly Gln Cys Tyr Ser Pro Phe Gln Val Asn Arg Ala Asn Pro Ser Ala Glu Asn

1090 1100 1110 1120 1130 *
 TGG ATC CTG GGT GAC GTC TTC CTG AGG CGG TAT TTC TCA GTC TTT GAT CGA GGA AAT GAC
 Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly Asn Asp

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGG ATT GGC CTG GCA CGG GCA GTG TAAATGCTGGGAGTGGTTTCAGGAATCAGTAAGGCTATC
 Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
 CTAACACACACTCACTACCCCTTTGGGCCTCCTGCCATGATGCTGGTGAATGGTATTGCTCGTGC

1280
 CGAATTCGGCAGGAGT

Figure 4

Séquences nucléotidique et des acides aminés de l'oPAG déduites du clonage moléculaire du cDNA. La flèche indique le site de clivage de la séquence signal et les étoiles, les sites potentiels de N-glycosylation.

(Ser) et -1 (Cys), les 38 acides aminés suivants constitueraient la séquence pro (Xie et al., 1991). La protéine mûre commencerait, comme pour la bPAG, par le résidu 39 (Arg) et serait donc constituée de 329 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 36.578 daltons (Fig. 4). L'oPAG comporte 4 sites potentiels de N-glycosylation et, si on suppose qu'elle contient également $\approx 10\%$ d'hydrates de carbone comme la bPAG (Zoli et al., 1991), la masse moléculaire serait encore inférieure à la valeur la plus faible obtenue par SDS-PAGE, soit 47.000. La différence entre la masse moléculaire calculée à partir du nombre des acides aminés et celle déterminée par SDS-PAGE s'expliquerait par le fait qu'à l'inverse des holoprotéines, les glycoprotéines fixent moins de SDS et, de ce fait, migrent plus lentement dans les gels d'électrophorèse entraînant une surestimation des masses moléculaires (Rosen, 1986).

Il a été montré que l'oPAG et la bPAG présentent une grande homologie au niveau de leurs structures primaires (Xie et al., 1991). La similitude nucléotidique est de 86 % et les deux protéines comptent 73 % de résidus d'acides aminés identiques. Cette homologie entre les structures primaires confirme la parenté immunologique déjà observée par RIA (Zoli et al., 1990) entre les deux protéines. Des recherches dans les banques de gènes révèlent que l'oPAG, tout comme la bPAG, appartient à la famille des protéases aspartiques (Xie et al., 1991). L'identité nucléotidique avec ces protéines est de $\approx 60\%$ et celle des acides aminés est de $\approx 50\%$. La similitude est surtout remarquable au niveau des deux régions correspondant au site actif de la pepsine où les résidus d'acides aminés de part et d'autre des acides aspartiques sont hautement conservés (Fig. 5). On peut cependant remarquer que l'acide aspartique du deuxième lobe est remplacé par la glycine (Gly). Cette substitution est à l'origine de l'importante modification observée au niveau de la structure tertiaire des régions du site actif par rapport à celle de la pepsine (Fig. 6 A & B). Il a été démontré que la substitution de

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

Figure 5

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

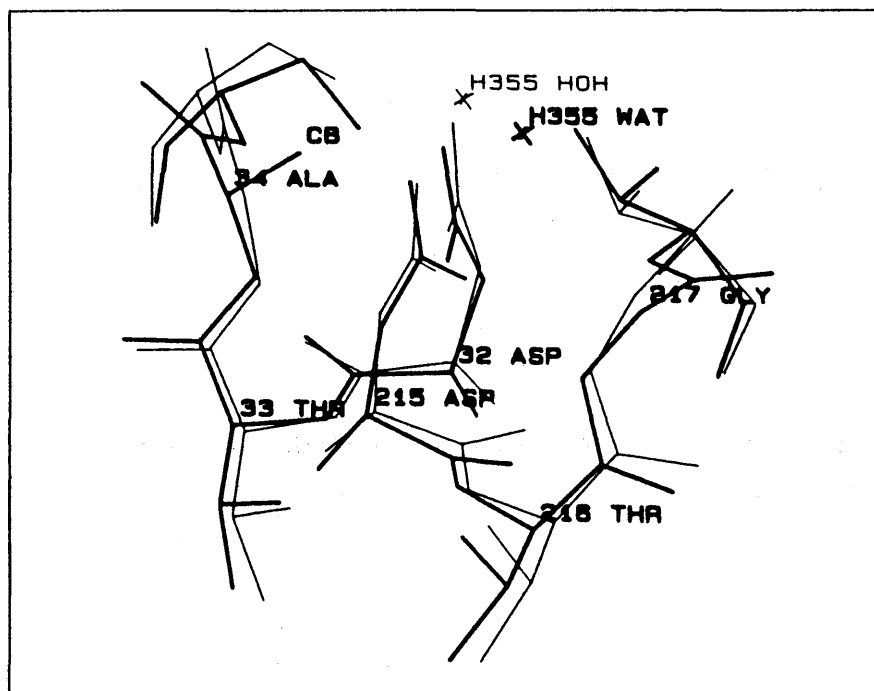


Figure 6A*

Modèles, dessinés par ordinateur, des régions hautement conservées de la pepsine (A : traits fins) de la bPAG (A : traits gras) d'une part et de l'oPAG (B) d'autre part. Dans la figure B les lignes en gras représentent l'Asp78 (32). Remarquer l'absence de l'Asp257 (215) entraînant une modification importante de la structure du site actif déterminant pour l'activité catalytique.

* Avec l'autorisation du Professeur R. Michael ROBERTS de l'Université du Missouri-Columbia.

l'acide aspartique du premier lobe (Asp 32) par l'Alanine (mutation D 32 A) supprime toute activité catalytique de la pepsine même si celle-ci reste encore capable de lier son substrat, en l'occurrence la pepstatine A, avec une assez grande affinité (Lin et al., 1989). Dès lors on peut penser que la substitution d'un des acides aspartiques par la glycine est probablement responsable de l'inactivité protéolytique de l'oPAG observée par Xie et al. (1991).

La fonction de l'oPAG n'est pas encore connue; on peut cependant raisonnablement penser, vu son appartenance à la famille des protéases aspartiques, que cette protéine dont le site actif reste suffisamment conservé et qui pourrait fixer un substrat de conformation appropriée interviendrait dans le remodelage de l'attache placentaire. Ainsi l'oPAG pourrait, à partir d'une certaine concentration et/ou à la faveur d'un autre facteur produit en fin de gestation et qui reste à déterminer, acquérir une activité protéolytique et

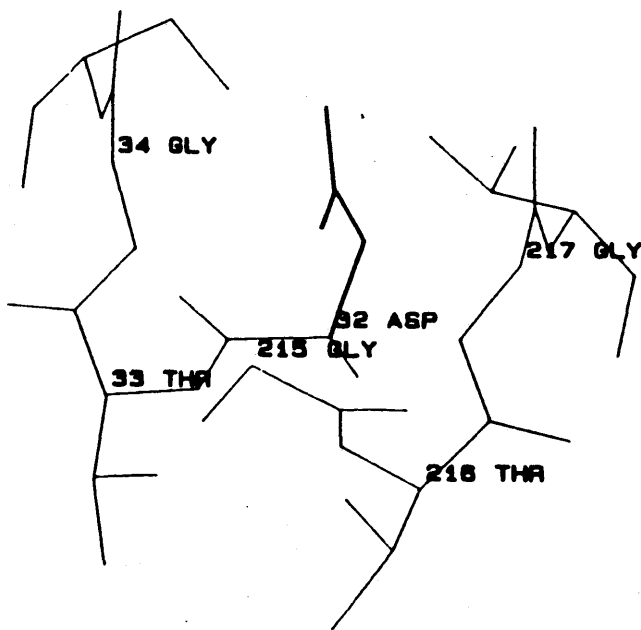


Figure 6B*

Modèles, dessinés par ordinateur, des régions hautement conservées de la pepsine (A : traits fins) de la bPAG (A : traits gras) d'une part et de l'oPAG (B) d'autre part. Dans la figure B les lignes en gras représentent l'Asp78 (32). Remarquer l'absence de l'Asp257 (215) entraînant une modification importante de la structure du site actif déterminant pour l'activité catalytique.

* Avec l'autorisation du Professeur R. Michael ROBERTS de l'Université du Missouri-Columbia.

jouer un rôle dans la digestion des moyens de fixation des villosités trophoblastiques dans les cryptes caronculaires, facilitant ainsi l'expulsion du placenta. Cette hypothèse nécessite cependant une vérification par exemple par l'étude des concentrations d'oPAG chez des femelles souffrant de rétention placentaire.

La détection de l'oPAG dans le sérum des brebis gestantes dès le 24e jour post-conceptionnel (Zoli, 1992c) pourrait constituer une mé-

thode sérologique alternative de diagnostic précoce de gestation chez cette espèce. Elle pourrait également, en association avec le dosage de la progestérone, servir à l'étude des mortalités embryonnaires tardives.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Pr R.M. Roberts (University of Missouri, Columbia, USA) pour sa col-

laboration, le Pr J. Derivaux pour la critique du manuscrit et Mme A. Brooze pour son assistance technique.

SUMMARY

Isolation and partial characterization of an ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein (oPAG)

An ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein (oPAG) has been isolated from fetal cotyledons by the means of ammonium sulfate precipitations and different liquid chromatographies. The bovine PAG was used as standard and tracer to monitor the oPAG in each step of isolation. Ovine PAG seems to be an heterogeneous group of glycoproteins of molecular mass ranging from 47 to 67 kD. Molecular cloning of its cDNA revealed that ovine and bovine PAG share 86 % nucleotide sequence identity and both belong to the aspartic proteinase family (≥ 50 % amino acid sequence identity to pepsin and cathepsins D and E). However neither bovine nor ovine PAGs do not appear to be enzymatically active. The oPAG's cDNA codes for a polypeptide of 382 amino acids long that is synthesized by trophoblastic binucleate cells since day 18 post conception and detected in maternal circulation since day 24 p.c. The detection of oPAG could be used for early diagnosis of pregnancy and determination of early embryonic mortality in sheep and other domestic and wild ruminants.

BIBLIOGRAPHIE

- AMOROSO, E.C. Placentation : Dans : AS. Parkes (ed.) Marshall's Physiology of Reproduction, Vol. II, 3e ed. London : Longmans, Green et Co, 1952.
- BECKERS, J.F., FROMONT-LIENART, 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, 124 : 585-601.
- BOLANDER, F.F., FELLOWS, R.E. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251 : 2703-2708.
- BUTLER, J.E., HAMILTON, W.C., SASSER, R.G., HASS, G.M., WILLIAMS, R.J. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.*, 1982, 26 : 925-933.
- CAMOUS, S., CHARPIGNY, G., GUILLOMOT, M., MARTAL, J., SASSER, R.G. Purification of one bovine pregnancy-specific protein by high performance liquid chromatography (HPLC). Dans : *Le début de la gestation. 27e réunion de la société française pour l'étude de la fertilité.* Paris, 1988. Abstract 83.
- CAMOUS, S., COSTE, V., GUILLOMOT, M., MARTAL, J. Demonstration of an ovine conceptus protein immunologically related to the bovine serum protein (PSP60) of Mr 60.000. *J. Reprod. Fert.*, 1991, Suppl. 43, Abstract 301.

- CERINI, M., FINDLAY, J.K., LAWSON, R.A.S. Pregnancy-specific antigens in sheep: application to the diagnosis of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 1976, **46**: 65-69.
- CHAN, J.D.S., ROBERTSON, H.A., FRIESSEN, H.G. The purification and characterization of ovine placental lactogen. *Endocrinol.*, 1976, **96**: 65-76.
- CURRIE, W.B., CARD, C.E., MICHEL, F.J., IGNOTZ, G. Purification, partial characterization, and development of an radioimmunoassay for goat placental lactogen. *J. Reprod. Fert.*, 1990, **90**: 25-36.
- GODKING, J.D., BAZER, F.W., MOFFATT, J., SESSIONS, F., ROBERTS, R.M. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J. Reprod. Fert.*, 1982, **65**: 141-150.
- HAIGH, J.C., GATES, C., RUDER, R., SASSER, R.G. Diagnosis of pregnancy in wood bison using a bovine assay for pregnancy-specific protein B. *Theriogenol.*, 1991, **36**: 749-754.
- HARTMAN, L., TOILLIEZ, M. Micro-méthode d'étude en gélose de la réaction antigène-anticorps (variante du procédé d'Ouchterlony). *Rev. Franç. Etud. Clin. Biol.*, 1957, **2**: 197-199.
- HUMBLLOT, P., DE MONTIGNY, G., JEANGUYOT, N., TETEDOLE, 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.
- IMAKAWA, K., ANTONY, R.V., KAZEMI, M., MAROTTI, K.R., PILOTES, H.G., ROBERTS, R.M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature*, 1987, **330**: 377-379.
- IMAKAWA, K., HANSEN, T.R., MALATHY, P.V., ANTONY, R.V., PILOTES, H.G., MAROTTI, K.R., ROBERTS, R.M. Molecular cloning and characterization of complementary deoxyribonucleic acids corresponding to bovine trophoblast protein 1: a comparison with ovine trophoblast 1 and bovine interferon- α II. *Endocrinol.* 1986, **3**: 127-139.
- LACROIX, M.C., MARTAL, J. Mise en évidence et évolution d'une gonadotrophine chorionique chez la brebis. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1979, **288**: 771-774.
- LIN, T.M., WONG, R.N.S., TANG, J. Synthesis, purification and active site mutagenesis of recombinant porcine pepsinogen. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**: 4482-4489.
- OUCHTERLONY, O. Antigène-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1949, **26**: 507-515.
- ROSEN, S.W. New placental proteins: Chemistry, Physiology and Clinical use. *Placenta*, 1986, **7**: 575-594.
- RUDER, C.A., SASSER, R.G., DAHMEN, J.J., STELLFLUG, J.N. Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for pregnancy-specific protein B. *Theriogenol.*, 1989, **29**: 905-912.
- SASSER, R.G., RUDER, C.A., IVANI, K.A. Pregnancy detection in farm animals by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in serum. In: Hau, J. (ed.) *Pregnancy Proteins in Animals*. Walter de Gruyter et Co; 1986, 511-517.
- 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 profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.*, 1986, **35**: 936-942.
- SHORT, J.M., FERNANDEZ, J.M., SORGE, J.A., HUSE, W.D. λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 1988, **16**: 7583-7600.
- STAPLES, L.D. Isolation and partial characterization of an antigen associated with pregnancy in ewe. *Biol. Reprod.* 1980, **22**: 675-685.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E., ROSS, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, **33**, 988.
- WARREN, W.C., KEISLER, D.H., ANTONY, R.V. Synthesis and secretion of ovine placental lactogen and its biochemical properties. *Dom. Ani. endocrinol.*, 1990, **7**, 331.
- WIMSATT, W.A. Observation on the morphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placental of ruminants. *Am. J. Anat.*, 1951, **89**: 233-282.
- WOODING, F.B.P., STAPLES, L.D. Binucleate cell migration in the bovine placenta. *J. Reprod. Fert.*, 1980a, **59**: 425-430.
- WOODING, F.B.P., CHAMBERS, S.G., PERRY, J.S., GEORGE, M., HEAP, R.B. Migration of the binucleate cells in the sheep placenta during normal pregnancy. *Anat. Embryol.*, 1980b, **158**: 361-370.
- WOODING, F.B.P., FLINT, A.P.F., HEAP, R.B., HOBBS, T. Autoradiographic evidence for migration and fusion of cells in sheep placenta: resolution of a problem in placental classification. *Cell Biol. Int. Rep.* 1981, **5**: 827-851.
- XIE, S., LOW, B.G., KRAMER, K.K., NAGEL, R.J., ANTONY, 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. U.S.A.*, 1991, **88** 10247-10251.
- XIE, S., NAGEL, R.J. Interconversion of Metabolically-labelled forms of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) of sheep. *Biol. Reprod.*, 1993, **48**: suppl. 1: Abst. 73.
- ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., ECTORS, F. Isolation of an ovine pregnancy-specific protein. *Theriogenol.*, 1990, **33**: (Suppl. 1). Abstract 366.
- ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., CLOSSET, J., BALLMAN-WOUTERS, P., FALMAGNE, P., ECTORS, F. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 1991, **45**: 1-10.
- ZOLI, A.P., GUILBAULT, L.A., DELAHAUT, P., BENITEZ-ORTIZ, W., BECKERS, J.F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its possible application for pregnancy diagnosis in cattle. *Biol. Reprod.*, 1992a, **46**: 83-92.
- ZOLI, A.P., DENEZ, P., BECKERS, J.F., REZNICK, M., BECKERS, A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placenta. *Biol. Reprod.*, 1992b, **46**: 623-629.
- ZOLI, A.P. Isolement et caractérisation partielle d'une protéine associée à la gestation (PAG) chez la brebis. Université de Liège (ed.) Thèse annexe. 1992, 22 pp.