

**L'HORMONE PLACENTAIRE
SOMATO-MAMMOTROPE
BOVINE**

Jean-François BECKERS
Docteur en Médecine Vétérinaire
Chercheur I.R.S.I.A.

Thèse présentée en vue de l'obtention du
grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur

**L'HORMONE PLACENTAIRE
SOMATO-MAMMOTROPE
BOVINE**

Jean-François BECKERS
Docteur en Médecine Vétérinaire
Chercheur I.R.S.L.A.

Thèse présentée en vue de l'obtention du
grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

LE PRESENT MEMOIRE PEUT ETRE LIVRE A L'IMPRESSION.

Bruxelles, le 18 mars 1983.

Le Secrétaire de la Faculté,
(s) A.KAECKENBEECK

Le Doyen de la Faculté,
(s) L.POULARD

Le Secrétaire du Jury,
(s) A.KAECKENBEECK

Article 6 de l'Arrêté Royal du 10 mars 1931 appliquant la loi du 21 mai 1929 sur la collation des grades académiques et le programme des examens universitaires: " En aucun cas, les opinions de l'auteur ne peuvent être considérées, par le fait de l'autorisation d'impression de la dissertation, comme étant cellés du Jury ou de l'Université."

REMERCIEMENTS.

Qu'il me soit permis, au terme de ce travail, d'exprimer ma gratitude et mon plus profond respect au Professeur J.Derivaux. Dès 1973, il m'a témoigné sa confiance, en m'accueillant dans son service. Ensuite, il n'a cessé de m'enseigner et de m'encourager, en me communiquant, avec un grand enthousiasme, son immense savoir façonné par son inégalable expérience. Les projets qu'il formait pour nos recherches sur l'étude de la régulation hormonale de la reproduction chez la vache, étaient éclairés et judicieux. Son intuition nous servait de guide; la confiance qu'elle m'inspirait a suscité ma motivation et nourri mon courage.

Qu'il me soit également permis d'exprimer toute ma reconnaissance à l'égard du Professeur F.Ectors. Dès mon arrivée dans le service, il m'a guidé sur les sentiers de l'étude de la régulation hormonale et des techniques permettant d'y accéder. Son message où dominant l'objectivité et la clairvoyance, la compétence et la modestie, il me l'a livré au cours des centaines d'heures, pendant lesquelles nous avons travaillé ensemble pour mettre au point les nouvelles expériences, pour les modifier, pour les affiner et enfin pour en discuter les applications possibles.

J'ai rencontré au sein du service d'Obstétrique et des Troubles de la Reproduction, un esprit d'accueil et d'entraide peu commun. Que mes Confrères, R.De Coster, A.Massip, Ch.Hanzen et M. De Fonseca, trouvent ici l'expression de ma sympathie. Au cours de nos discussions, j'ai pu apprécier l'étendue de leurs connaissances et leur grande perspicacité.

Mes remerciements les plus cordiaux s'adressent aux différentes personnes qui font partie de notre équipe: Madame P.Wouters-Ballman, Madame Ch.Fromont-Liénard, Madame F.Steux-Leruth, Madame M.Geyselings-Barthélémy, Mademoiselle M.Saudoyez et Monsieur P.Van Der Zwalmen. Elles ont, chacune à leur manière, collaboré à mon travail avec une compétence et un dévouement qui m'ont ému. Que chacune soit assurée de ma bienveillance.

Ces recherches n'auraient pas été possibles sans le soutien financier de l'IRSIA. Nous sommes reconnaissants aux différentes personnes qui animent cet organisme et en particulier à Messieurs J.Van Keymeulen, A.Marchal, J.Ferange et J.Weerts.

Nous remercions également le NIH qui nous a fourni gracieusement les préparations hormonales nécessaires au développement de notre recherche.

En octobre 1976, le Professeur G.Hennen m'a accueilli dans son unité dans laquelle j'ai pu me familiariser avec les techniques de purification des hormones glycoprotéiques. Je lui en suis très reconnaissant, mes remerciements s'adressent également aux différentes personnes qui constituent son équipe et notamment aux Docteurs J.Closset, J.L. Vandalem et F.Frankenne ainsi qu'au Professeur G.Maghuin-Rogister. A maintes reprises, j'ai bénéficié de leurs conseils judicieux et de leur critique constructive.

Tous mes remerciements s'adressent au Professeur C.Robyn avec qui j'ai eu des échanges aussi nombreux que fructueux, notamment en ce qui concerne les dosages radio-immunologiques de la prolactine.

Je remercie également les Professeurs et mes Collègues de la Faculté de Médecine Vétérinaire, tous à un moment ou

à un autre m'ont offert leur collaboration.

Madame Ch.Fromont-Liénard a accepté de se charger de la dactylographie de ce mémoire et, s'en est acquittée avec dynamisme et bonne humeur; je l'en remercie chaleureusement.

Enfin, dans l'ensemble des personnes à qui je pense avec tendresse et affection, qu'il me soit permis d'évoquer mes parents, mes frères et mes soeurs.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

b	: bovin(e)
e	: équin(e)
h	: humain(e)
o	: ovin(e)
GH	: hormone de croissance, hormone somatotrope, somatotropine
bGH-NIH-B18	: hormone de croissance bovine, standard du NIH n° 18
PRL	: prolactine
bPRL-NIH-B4	: prolactine bovine, standard du NIH n° 4
hCG	: hormone chorionique gonadotrope humaine, chorio-gonadotropine humaine
hPL	: hormone lactogène placentaire humaine
ou	
hCS	: hormone chorionique somato-mammotrope humaine
HPSM	: hormone placentaire somato-mammotrope bovine
ou	
bPL	: hormone lactogène placentaire bovine
ou	
bCS	: hormone chorionique somato-mammotrope bovine
FSH	: follitropine, hormone folliculostimulante
LH	: lutropine, hormone lutéinisante
PMSG	: hormone gonadotrope sérique de jument gravide
ou	
eCG	: hormone chorionique gonadotrope équine
NIH	: National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
ou	
NIAMDD	: National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases

g	: gramme; s'il s'agit de centrifugation, g signifie accélération de la pesanteur
ng	: nanogramme
pg	: picogramme
nm	: nanomètre
SDS	: sodium dodecyl sulfate ou sodium lauryl sulfate
Tris	: tris(hydroxyméthyle) aminométhane
BSA	: albumine sérique bovine
DEAE	: diéthylaminoéthyle
CM	: carboxyméthyle
SP	: sulfopropyle
PM	: poids moléculaire
pHi	: point ou pH isoélectrique
M	: Mole/litre, molaire
pM	: picomole/litre, picomolaire
Ka	: constante d'association à l'équilibre
k ₁	: constante de vitesse d'association
k ₂	: constante de vitesse de dissociation
Ci	: Curie
mCi	: millicurie
μCi	: microcurie
pCi	: picocurie
UI	: unité internationale
mUI	: milliunité internationale
ml	: millilitre
μl	: microlitre
cpm	: coups par minute
dpm	: désintégrations par minute, unité de radioactivité correspondant à 0,45 pCi
tpm	: tours par minute
mmole	: millimole
pmole	: picomole
nmole	: nanomole
fmole	: femtomole
éq.GH	: quantité d'HPSM équivalente à la quantité d'hormone de croissance exprimée dans le dosage par liaison radiocompétitive de cette hormone

- éq. PRL : quantité d'HPSM équivalente à la quantité de prolactine exprimée dans le dosage par liaison radiocompétitive de cette hormone
- B/Bo : hormone radiomarquée liée spécifiquement en présence d'hormone froide par rapport à l'hormone radiomarquée liée spécifiquement en absence d'hormone froide
- logit B/Bo : $\ln \frac{(B/Bo)}{(1-B/Bo)}$

TABLE DES MATIERES

0.	INTRODUCTION	1.
0.1.	HORMONES PRESENTANT UNE ACTIVITE GONADOTROPE	6.
0.1.1.	hCG	6.
0.1.2.	PMSG ou eCG	8.
0.1.3.	oCG	10.
0.1.4.	bCG	11.
0.2.	PROTEINES PLACENTAIRES N'AYANT PAS D'ACTIVITE HORMONALE CONNUE	12.
0.3.	HORMONES STEROIDES	13.
0.4.	HORMONES PRESENTANT UNE ACTIVITE SOMATOTROPE ET MAMMOTROPE	16.
0.4.1.	hPL ou hCS	16.
0.4.2.	oPL ou oCS	25.
0.4.3.	bPL, bCS ou HPSM	28.
1.	CHAPITRE I. CHOIX ET MISE AU POINT DES METHODES PERMETTANT DE REPERER L'ACTIVITE HORMONALE DE L'HPSM	31.
1.1.	INTRODUCTION	31.
1.2.	MATERIELS ET METHODES	34.
1.2.1.	Préparation des réactifs	34.
1.2.1.1.	<i>Radiomarquage des hormones à l'iode 125</i>	34.
1.2.1.2.	<i>Préparation des récepteurs membranaires</i>	35.
1.2.2.	Dosages	37.
1.2.2.1.	<i>Dosage de la prolactine</i>	37.
1.2.2.2.	<i>Dosage de l'hormone de croissance</i>	38.
1.2.3.	Définitions des paramètres des dosages par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires	39.
1.2.3.1.	<i>Radioactivité totale (T)</i>	39.

1.2.3.2.	<i>Liaison totale (B_T)</i>	39.
1.2.3.3.	<i>Liaison non spécifique (NSB)</i>	39.
1.2.3.4	<i>Liaison spécifique (B)</i>	40.
1.2.3.5.	<i>Capacité maximale de liaison de l'hormone radiomarquée (B_{max}/T)</i>	40.
1.2.3.6.	<i>Fraction intacte de l'hormone radiomarquée (FI)</i>	41.
1.2.3.7.	<i>Radioactivité spécifique (RS)</i>	41.
1.2.4.	Caractéristiques des préparations hormonales	45.
1.2.4.1.	<i>bPRL-NIH-B4</i>	45.
1.2.4.2.	<i>bGH-NIH-B18</i>	45.
1.3.	RESULTATS	46.
1.3.1.	Dosage de la prolactine	46.
1.3.2.	Dosage de l'hormone de croissance	46.
1.4.	DISCUSSION	46.
2.	CHAPITRE II, ISOLEMENT DE L'HORMONE	51.
2.1.	INTRODUCTION	51.
2.2.	MATERIELS ET METHODES	51.
2.2.1.	Extraction de l'hormone	51.
2.2.1.1.	<i>Recherche de la partie du placenta la plus riche en hormone</i>	51.
2.2.1.2.	<i>Recherche de l'époque de la gestation la plus favorable pour le prélèvement</i>	52.
2.2.1.3.	<i>Recherche du procédé optimal d'extraction</i>	52.
2.2.1.4.	<i>Développement du procédé d'extraction</i>	52.
2.2.2.	Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium	54.
2.2.3.	Purification des protéines par chromatographie	55.
2.2.3.1.	<i>Chromatographie sur résine échangeuse d'anions</i>	55.
2.2.3.2.	<i>Chromatographie d'hydrophobicité</i>	56.
2.2.3.3.	<i>Chromatographie d'affinité sue Blue Sepharose CL-6B</i>	57.
2.2.3.4.	<i>Production d'une colonne d'affinité spécifique de l'albumine sérique bovine</i>	58.

2.2.3.5.	Production d'une colonne d'affinité spécifique de l'hémoglobine bovine	60.
2.2.3.6.	Conditions d'utilisation d'une colonne d'affinité spécifique de l'albumine et de l'hémoglobine dans le schéma de purification	63.
2.2.3.7.	Chromatographie d'affinité sur Mätrex Gel Red A	64.
2.2.3.8.	Dialyse et lyophilisation	64.
2.3.	RESULTATS	64.
2.3.1.	Extraction de l'hormone	65.
2.3.1.1.	Partie du placenta la plus riche en hormone	65.
2.3.1.2.	Epoque de la gestation la plus favorable pour le prélèvement	65.
2.3.1.3.	Procédé optimal d'extraction	65.
2.3.2.	Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium	68.
2.3.3.	Purification de l'HPSM par chromatographie	68.
2.3.3.1.	Chromatographie sur résine échangeuse d'anions, DEAE-Sephadex A-25	68.
2.3.3.2.	Chromatographie d'hydrophobicité sur Phenyl-Sepharose CL-4B	70.
2.3.3.3.	Chromatographie d'affinité sur Blue Sepharose CL-6B	70.
2.3.3.4.	Chromatographie d'affinité sur Sepharose 4B spécifique de l'albumine sérique et de l'hémoglobine foetale bovines	73.
2.3.3.5.	Chromatographie sur Mätrex Gel Red A	75.
2.3.3.6.	Dialyse et lyophilisation	75.
2.3.4.	Schéma de purification de l'HPSM	75.
2.4.	DISCUSSION	81.
3.	CHAPITRE III, ETUDE DES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HPSM	85.
3.1.	INTRODUCTION	85.
3.2.	MATERIELS ET METHODES	85.
3.2.1.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide	85.

3.2.2.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide réalisée en présence de SDS	87.
3.2.3.	Focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide	88.
3.2.4.	Etude du poids moléculaire	90.
3.2.5.	Etude du point isoélectrique	90.
3.2.5.1.	Etude du pH_i par une série d'électrophorèses réalisées à différents pH	90.
3.2.5.2.	Etude du pH_i par focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide	91.
3.3.	RESULTATS	91.
3.3.1.	Homogénéité de la préparation d'HPSM	91.
3.3.1.1.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide	
3.3.1.2.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS	92.
3.3.1.3.	Focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide	92.
3.3.2.	Poids moléculaire (PM)	92.
3.3.3.	Point isoélectrique (pH_i)	92.
3.4.	DISCUSSION	96.

4.	CHAPITRE IV. ETUDE DE LA LIAISON DE L'HPSM AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DE LAPINE GESTANTE	99.
4.1.	INTRODUCTION	99.
4.2.	MATERIELS ET METHODES	100.
4.2.1.	Radiomarquage de l'HPSM à l'iode 125	100.
4.2.2.	Préparation des fractions tissulaires riches en récepteurs	100.
4.2.3.	Préparation de l'HPSM native	100.
4.2.4.	Mesure de la liaison de l'HPSM aux récepteurs	101.
4.2.4.1.	Récepteurs hépatiques	101.
4.2.4.2.	Récepteurs mammaires	101.
4.2.5.	Description des méthodes d'analyse des résultats	101.
4.2.5.1.	Analyse du parallélisme des courbes d'inhibition	101.

4.2.5.2.	Analyse des données expérimentales obtenues à l'équilibre: détermination de la constante d'association (K_a) et du nombre de sites de fixation	102.
4.3.	RESULTATS	108.
4.3.1.	Liaison de l'HPSM radioactive aux récepteurs	108.
4.3.1.1.	Liaison de l'HPSM ¹²⁵ I aux récepteurs hépatiques	108.
4.3.1.2.	Liaison de l'HPSM ¹²⁵ I aux récepteurs mammaires	108.
4.3.2.	Etude comparative de l'HPSM purifiée et de l'HPSM native présente dans les cotylédons	110.
4.3.3.	Etude comparative des liaisons de l'HPSM, de la prolactine et de l'hormone de croissance aux récepteurs hépatiques et mammaires de lapine gestante	115.
4.3.3.1.	Liaison de l'HPSM aux récepteurs hépatiques	115.
4.3.3.2.	Liaison de l'hormone de croissance aux récepteurs hépatiques	117.
4.3.3.3.	Liaison de la prolactine aux récepteurs hépatiques	118.
4.3.3.4.	Liaison de l'HPSM aux récepteurs mammaires	121.
4.3.3.5.	Liaison de la prolactine aux récepteurs mammaires	123.
4.4.	DISCUSSION	123.

5.	CHAPITRE V. MISE EN ÉVIDENCE ET CARACTÉRISATION DE SITES RÉCEPTEURS DE TYPE SOMATOTROPE ET DE TYPE PROLACTINIQUE CHEZ LA VACHE	131.
5.1.	INTRODUCTION	131.
5.2.	MATERIELS ET METHODES	132.
5.2.1.	Préparation des fractions tissulaires	132.
5.2.2.	Mode opératoire pour mettre en évidence une liaison de l'hormone aux sites récepteurs	133.
5.2.3.	Etude des caractéristiques de liaisons	133.

5.3.	RESULTATS	133.
5.3.1.	Mise en évidence des sites récepteurs	133.
5.3.2.	Caractéristiques des sites récepteurs	135.
5.3.2.1.	<i>Liaison de l'HPSM aux sites récepteurs hépatiques de vache gestante</i>	135.
5.3.2.2.	<i>Liaison de l'HPSM aux sites récepteurs de l'endomètre</i>	135.
5.3.2.3.	<i>Liaison de l'HPSM aux sites récepteurs du corps jaune</i>	138.
5.3.2.4.	<i>Liaison de l'HPSM aux sites récepteurs de la glande mammaire</i>	138.
5.4.	DISCUSSION	145.
6.	CHAPITRE VI. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HPSM	149.
6.1.	INTRODUCTION	149.
6.2.	MATERIELS ET METHODES	149.
6.2.1.	Antisérums	149.
6.2.1.1.	<i>Production</i>	149.
6.2.1.2.	<i>Caractérisation</i>	150.
6.2.2.	Hormone radiomarquée	151.
6.2.2.1.	<i>Production</i>	151.
6.2.2.2.	<i>Caractérisation</i>	151.
6.2.3.	Séparation des fractions libre et liée	152.
6.2.4.	Dosage	152.
6.2.5.	Extraction de l'HPSM native	154.
6.3.	RESULTATS	154.
6.3.1.	Sensibilité	154.
6.3.2.	Spécificité	155.
6.3.3.	Comparaison des concentrations déterminées par dosage radioimmunologique et par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires	155.
6.4.	DISCUSSION	159.

7.	CHAPITRE VII, APPLICATIONS DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HPSM	161.
7.1.	INTRODUCTION	161.
7.2.	MATERIELS ET METHODES	162.
7.2.1.	Procédure du dosage radioimmunologique de l'HPSM	162.
7.2.2.	Mise au point d'un dosage radioimmunologique de la prolactine	162.
7.2.3.	Mise au point d'un dosage radioimmunologique de l'hormone de croissance	163.
7.2.4.	Prélèvement des cotylédons foetaux et maternels, extraction de l'hormone	164.
7.2.5.	Collecte des liquides foetaux	165.
7.2.6.	Prélèvement des échantillons de sang de vaches gestantes	165.
7.3.	RESULTATS	165.
7.3.1.	Concentration en HPSM des cotylédons maternels et foetaux	165.
7.3.2.	Concentration des liquides amniotiques et allantoïdiens en HPSM et en prolactine	166.
7.3.3.	Concentration du sérum foetal en HPSM, en prolactine et en hormone de croissance	168.
7.3.4.	Concentration sérique de l'HPSM chez la vache gestante	168.
7.4.	DISCUSSION	168.
8.	DISCUSSION GÉNÉRALE	175.
9.	RÉSUMÉ	183.
10.	BIBLIOGRAPHIE	185.

Dans le cadre de nos recherches cliniques et expérimentales sur la physiopathologie de la reproduction chez la vache, nous avons étudié, dans un premier temps, les sécrétions hypophysaires et ovariennes. Le but essentiel de ces recherches était de mieux comprendre la régulation de l'activité sexuelle au cours du cycle oestral ainsi que lors de certains états pathologiques s'accompagnant d'une perturbation de cette activité (Derivaux et coll.,1976 a,b,c; Beckers et coll.,1978).

Pour réaliser ces études, une bonne part de notre travail de recherche a porté sur la mise au point de différents systèmes de dosages hormonaux notamment des hormones stéroïdes (Beckers et coll.,1975 a,b; Ectors et coll.,1975; Massip et coll.,1977; De Coster et coll.,1979).

Dès 1971, les travaux de Robertson et Sarda permettaient d'entrevoir l'utilisation du dosage de la progestérone comme moyen de diagnostic précoce de la gestation chez les différentes espèces animales. Cette méthode consiste à doser la progestérone lorsque la durée d'un cycle s'est écoulée depuis la saillie ou l'insémination artificielle. Si l'animal est gestant, le taux de progestérone reste élevé tandis que dans le cas contraire, le corps jaune a subi la lutéolyse, une nouvelle phase folliculaire s'est développée et le taux de progestérone est faible.

Le dosage peut s'effectuer dans le sérum, dans le lait (Heap et coll.,1973) ou encore dans le crème du lait(Hoffmann et coll.,1977).

Pour rendre ce type de diagnostic applicable en routine, il restait à préciser les conditions de conservation des échantillons durant le laps de temps nécessaire à leur acheminement vers le laboratoire. Pour empêcher la multiplication bactérienne, le lait est additionné de dichromate de potassium; pour inhiber la dégradation enzymatique de la progestérone au contact des globules rouges, le sang est additionné d'azide de sodium (Delahaut et coll.,1979).

L'obligation de connaître la date de la saillie limite quelque peu le champ d'application du diagnostic de gestation basé sur le dosage de la progestérone. Cette situation nous a amenés à rechercher d'autres méthodes reposant sur la mise en évidence ou le dosage d'une hormone ou d'une protéine spécifique du placenta.

Avant d'entamer l'exposé de nos recherches et pour mieux les situer, nous décrirons brièvement la morphologie du développement embryonnaire et du placenta chez la vache.

Peu de temps après la fécondation, l'oeuf entame sa phase de multiplication qui le conduira successivement au stade de 8 cellules vers le 3^e jour après la fécondation; au stade morula vers le 4^e-6^e jour et au stade de blastula entre le 7^e et le 8^e jour (Chang,1952; Betteridge,1977).

Le blastocyste sort de la membrane pellucide vers le 9^e ou 10^e jour. Dès ce moment, le trophoblaste prend l'aspect d'un sac fusiforme dont la taille est approximativement de 0,18 mm de long vers le 10^e jour et de 160 mm vers le 18^e jour.

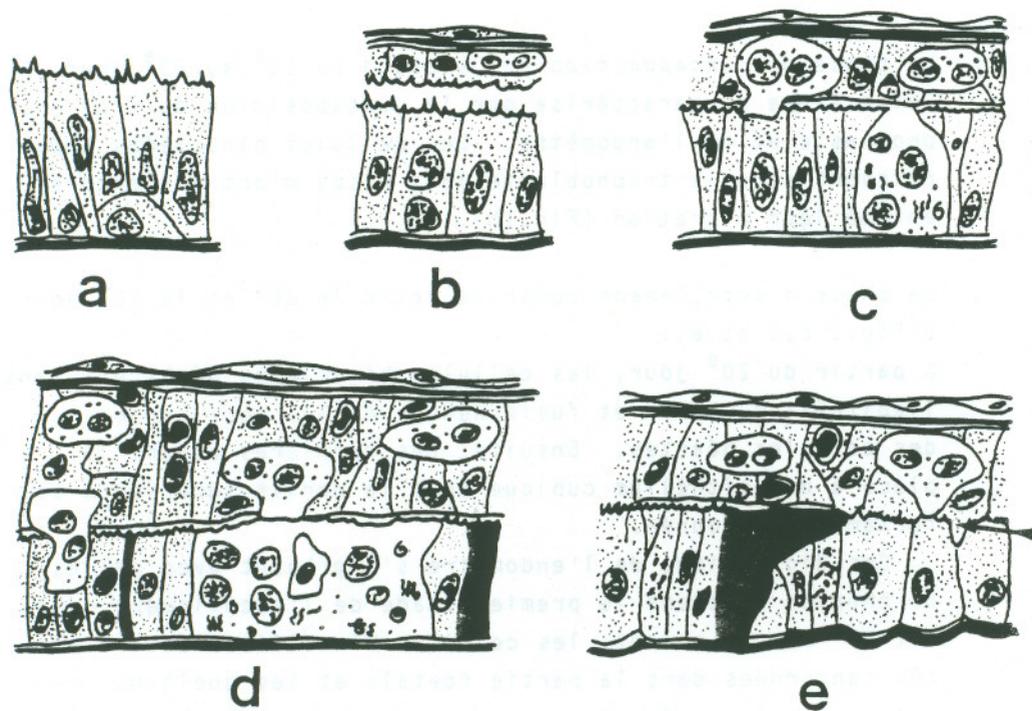
Vers le 20^e jour enfin, son développement lui permet d'atteindre la deuxième corne utérine.

Les rapports entre le blastocyste et l'endomètre s'établissent progressivement et leur évolution peut se décomposer comme suit:

- a) La phase de *vie libre* qui s'étend jusqu'au 18^e jour.
Durant cette période, le blastocyste se nourrit des sécrétions et des débris épithéliaux en provenance de l'endomètre (Fig.1a).
- b) La phase de *juxtaposition* qui s'étend du 18^e au 20^e jour.
Cette étape se caractérise par la juxtaposition du trophoblaste et de l'endomètre. Des cellules binucléées apparaissent dans le trophoblaste mais elles n'ont pas encore entamé leur migration (Fig.1b).
- c) La phase d'*accolement* comprise entre le 20^e et le 28^e jour (Fig.1 c,d et e).
A partir du 20^e jour, les cellules binucléées pénètrent dans l'épithélium utérin et fusionnent avec lui pour donner des cellules géantes. Ensuite, ces dernières cèdent la place à un épithélium cubique dont la partie supérieure est fortement festonnée.
Ces digitations de l'endomètre s'engrènent avec celles du chorion et c'est le premier stade de l'accolement définitif. Dès ce moment, les cellules binucléées restent plutôt cantonnées dans la partie foetale et les quelques migrations qui se déroulent encore durant la gestation ne s'accompagnent plus de remaniement de l'épithélium utérin (Greenstein et coll.,1958; Wathes et Wooding,1980).
- d) La période *cotylédonnaire*.
Les premières ébauches de cotylédons se forment vers le 28^e- 30^e jour. Elles se présentent d'abord sous l'aspect de plages rouges apparaissant à la surface du chorion en face des " cotylédons utérins". Leurs villosités s'interpénètrent pour assurer une surface d'échange importante entre la mère et le foetus.

Le placenta formé est de type localisé, cotylédonnaire, épithélio-chorial: l'épithélium utérin et l'épithélium chorial

Fig.1 - FORMATION DES PREMIÈRES CONNEXIONS PLACENTAIRES
CHEZ LES BOVINS.



- a. Epithélium utérin normal
- b. Phase de juxtaposition
- c. Premières migrations des cellules binucléées dans l'épithélium utérin
- d. Formation des cellules géantes multinucléées et remaniement de l'épithélium utérin
- e. Premiers engrènements des villosités placentaires →

sont en contact étroit mais six couches histologiques séparent les circulations maternelle et foetale. Ce sont successivement, l'endothélium des capillaires du chorion, le tissu conjonctif et l'épithélium chorial d'une part, l'épithélium endométrial, le tissu conjonctif et l'endothélium des capillaires utérins d'autre part.

Le cotylédon utérin ou maternel est constitué d'un bouquet de villosités soutenues par un axe conjonctivo-vasculaire; il devient palpable par fouiller rectal à partir du 4^e mois. Le nombre de cotylédons varie de 80 à 120.

D'un développement proportionnel à celui du cotylédon maternel, le cotylédon trophoblastique ou foetal fait partie intégrante du chorion; il est pourvu d'une vascularisation importante.

Après cette description succincte des différentes parties constitutives du placenta, nous passerons en revue les principales substances qu'il sécrète dans l'espèce humaine, ovine, équine ainsi que bovine.

Nous avons classé ces produits de sécrétion en quatre grandes catégories:

- hormones présentant une activité gonadotrope
- protéines placentaires n'ayant pas d'activité hormonale connue actuellement
- hormones stéroïdes
- hormones présentant une activité somatotrope et mammatrope.

0.1. HORMONES PRESENTANT UNE ACTIVITE GONADOTROPE

0.1.1. HCG

Dès 1927, Aschheim et Zondek mettent en évidence par dosage biologique, une activité gonadotrope dans l'urine de femme enceinte. Par la suite, de nombreux travaux sont consacrés à cette hormone et permettent de préciser son origine, sa structure, son activité et sa concentration dans le sang et dans l'urine.

L'étude chimique de l'hCG a été réalisée essentiellement par Bellisario et coll.(1973) et Carlsen et coll.(1973) ainsi que par Morgan et coll.(1975).

L'hCG est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de ≈ 38.000 . Elle est constituée de deux sous-unités; la sous-unité α et la sous-unité β .

La première comprend une chaîne peptidique de 92 acides aminés et deux chaînes oligosaccharidiques greffées sur les acides aminés occupant les positions 52 et 78. Cette sous-unité α est presque identique à la sous-unité α de l'hormone lutéinisante humaine (hLH α).

La sous-unité β , constituée de 145 acides aminés, présente également une grande similitude avec la sous-unité β de la LH humaine (hLH β): 115 acides aminés sont identiques. La sous-unité β d'hCG comporte en outre 30 acides aminés supplémentaires du côté carboxyl-terminal de la séquence et plusieurs chaînes glycosidiques attachées à l'asparagine, en position 13 et 30 ainsi qu'à la sérine en position 118, 119 et 131.

L'hCG est produite par le tissu placentaire essentiellement au niveau du syncytiotrophoblaste (Midgley et Pierce,

1962). Il semblerait cependant que la sous-unité α puisse aussi être synthétisée au niveau du cytotrophoblaste (Franchimont et coll.,1972).

Différentes méthodes *in vitro* permettent de détecter l'hCG dans le sang et dans l'urine dès le 8^e-12^e jour après la fécondation (Marshall et coll.,1968; Kosasa et coll.,1974a; Mishell et coll.,1974). Sa concentration dans le sang et dans l'urine est très élevée durant le premier trimestre de la grossesse (Jones et coll.,1944).

Il paraît raisonnable d'attribuer à l'hCG le rôle de " signal embryonnaire" permettant le maintien de la gestation, car elle assure la persistance du corps jaune et stimule la sécrétion de progestérone (Stock et coll.,1971).

L'apparition précoce de l'hCG et les concentrations élevées rencontrées en début de gestation ont permis la mise au point d'une série de tests de diagnostic précoce de la grossesse. La détection et le dosage de l'hCG ont pu se faire suivant différentes méthodes, biologiques d'abord, immunologiques ensuite et enfin celles utilisant pour la réaction de compétition, une préparation de récepteurs membranaires.

Depuis la publication de Midgley et Ram (1965), de nombreux systèmes de dosages radioimmunologiques ont été mis au point mais tous présentaient une réaction croisée importante avec la LH.

Quelques années plus tard, en immunisant des lapins au moyen de la sous-unité β d'hCG purifiée, différents auteurs sont parvenus à préciser les conditions d'un dosage radioimmunologique plus spécifique (Vaitukaitis et coll.,1972; Kosasa et coll.,1974b; Hennen et coll.,1976).

Le dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires est réalisé par liaison de l'hormone à une

préparation membranaire obtenue à partir de corps jaunes de bovins, (Saxena et coll.,1974), d'homogénats testiculaires de rats (Catt et coll.,1972 ; Ketelslegers et coll.,1974) ou d'homogénats de corps jaunes de rates en pseudogestation induite par l'administration de PMSG et d'hCG (Lee et Ryan,1975).

0.1.2. PMSG ou eCG

Dès 1930, Cole et Hart mettent en évidence la PMSG dans le sang de juments gravides. Sécrétée par les cupules endométriales, cette gonadotropine est présente dans le sang de la jument du 40^e au 130^e jour de la gestation (Cole et Hart, 1942).

Décrites pour la première fois en 1912 par Schauder puis par Clegg et coll.(1954) et Amoroso (1955), les cupules endométriales font leur apparition dès le 36^e ou 38^e jour de la gestation et se présentent comme une série de plages plus pâles disposées tout autour de la vésicule ombilicale. Elles se développent assez rapidement pour atteindre 2 à 10 cm de long sur 1 à 3 cm de large entre le 60^e et le 75^e jour de la gestation (Moor et coll.,1975); elles commencent à régresser à partir du 100^e jour pour disparaître complètement au 130^e- 150^e jour. A partir du 75^e jour, le centre des cupules contient un produit d'aspect compact, pâteux, melleux dont la teneur en PMSG atteint 1.000.000 UI par gramme de tissu frais (Clegg et coll.,1954).

Les cupules endométriales en activité sont constituées de grandes cellules assez semblables aux cellules lutéales possédant parfois 1 ou 2 gros noyaux et un cytoplasme pâle.

Allen et Moor (1972) ont montré que ces cupules endomé-

triales sont en réalité constituées de cellules du trophoblaste qui colonisent l'endomètre aux environs du 36^e- 38^e jour de la gestation.

Durant la gestation, l'ânesse sécrète également de la PMSG mais en quantité moindre que la jument.

La jument saillie par un âne et donc gestante d'une mule ou d'un mulet n'en sécrète pratiquement pas; par contre, l'ânesse saillie par un étalon et donc gestante d'un bardot (ou bardeau) produit de la PMSG en très grande quantité (Allen ,1975).

La PMSG est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de \approx 64.000 contenant un pourcentage élevé de sucres (46,7%) et d'acide sialique (13,5 %).

Elle est constituée de 2 sous-unités , α et β , dont l'association est indispensable à l'activité biologique (Gospodarowicz et Papkoff,1967; Papkoff,1974; Papkoff et coll.,1978; Christakos et Bahl,1979).

Alors que l'hCG possède essentiellement une activité de type LH (Brody,1969; Louvet et coll.,1976), la PMSG est douée à la fois d'une activité FSH et LH. Chez le rat, cette double activité est mise en évidence tant par les dosages biologiques (Papkoff, 1974;Papkoff et coll.,1978) que par les dosages par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires (Stewart et coll.,1976).

La mise en évidence de la PMSG dans le sérum de la jument gestante peut s'effectuer par des méthodes biologiques (Aschheim et Zondek,1928a;1928b; Friedmann,1929; Gailli-Mainini,1947) et immunologiques (Wide et Wide,1963; Allen,1969; Ikemoto et coll.,1964,1965; Richards,1967;De Coster et coll., 1980).

Jusqu'à présent, il n'existe pas encore de dosage radio-immunologique homologue et spécifique de la PMSG car tous

Les systèmes présentent une réaction croisée importante avec les gonadotropines hypophysaires équines. Cela tient probablement à la grande similitude de structure entre la PMSG et les hormones hypophysaires gonadotropes dans cette espèce. Suite aux travaux de Moore et coll. (1981) cités par Pierce et Parsons (1981), il semble que les séquences de la PMSG, de la FSH et de la LH équines présentent un degré important de similitude.

0.1.3. oCG

Un certain nombre d'expériences montrent que le blastocyste de brebis exerce une activité lutéotrope. En effet, Rowson et Moor (1967) prolongent la vie du corps jaune chez la brebis en injectant dans l'utérus des homogénats d'embryons prélevés au 13^e-14^e jour de la gestation.

Parallèlement, Godkin et coll. (1978) ont montré que des homogénats de même type (13^e-15^e jour) stimulent la production de progestérone par les cellules lutéales maintenues en culture.

Lacroix et Martal (1979) sont parvenus, au moyen d'un dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires de corps jaune, à mettre en évidence un facteur lutéotrope d'origine placentaire (oCG). Ce facteur lutéotrope est détectable dans les extraits de placenta dès le 15^e jour après la fécondation et atteint sa concentration maximale au 130^e jour de la gestation. L'oCG est susceptible de contrôler la sécrétion de progestérone par le corps jaune.

0.1.4. BCG

Tous les essais de mise en évidence d'une activité gonadotrope dans le sang et l'urine de la vache gestante par des méthodes biologiques se sont révélés infructueux (Foster, 1956).

Cependant, Foote et Kaushik (1963) utilisant la méthode de Parlow (1961), détectent une activité gonadotrope de type LH dans les placentas prélevés au 150^e jour de la gestation.

En 1980, Northey et French injectent dans l'utérus de vaches cyclées des broyats d'embryons prélevés au 15^e-18^e jour et constatent une prolongation de la durée de vie du corps jaune.

Parallèlement, Beal et coll. (1981) montrent que ces mêmes homogénats stimulent la production de progestérone par les cellules lutéales en culture.

Lukaszewska et Hansel (1980) et Humblot (1981) ont constaté, qu'entre le 10^e et le 18^e jour après la saillie, les concentrations plasmatiques de progestérone sont plus élevées chez les vaches gestantes que chez les vaches cyclées. Cette observation tend à montrer que, dès cette époque, l'embryon peut produire une ou plusieurs substances lutéotropes capables de stimuler la production de progestérone par le corps jaune.

Ces expériences, encore incomplètes, semblent toutefois démontrer l'existence chez la vache, d'une hormone chorionique gonadotrope de type bCG.

0.2. PROTEINES PLACENTAIRES N'AYANT PAS D'ACTIVITE HORMONALE CONNUE.

Dans une revue publiée en 1979, Bohn rapporte la mise en évidence de plusieurs protéines spécifiques de la *grossesse* (Schwangerschaftsproteine, SP et Plazentaproteine, PP).

Quelques unes ont été purifiées par des techniques de précipitation et de chromatographie. Au cours de ces purifications, elles étaient identifiées par des méthodes électrophorétiques et immunologiques.

Certaines d'entre elles (la SP₁ et la PP₅) présentent un intérêt clinique non négligeable car elles permettent de surveiller la fonction placentaire et de suivre l'évolution de certaines tumeurs trophoblastiques.

La SP₁, glycoprotéine d'un poids moléculaire de 90 à 110.000 (Teisner et coll., 1980) est dosée par méthode radio-immunologique. Elle est détectable dans le sang maternel dès le 13^e-20^e jour suivant la fécondation; son taux s'élève ensuite régulièrement pour atteindre 150 µg/ml aux environs de la 40^e semaine de la grossesse.

La demi-vie de cette protéine est relativement longue (= 30 heures).

La PP₅ est dosée par méthode immunologique et peut présenter un réel intérêt dans la surveillance de la grossesse (Obiekwe et coll., 1980).

Ces différentes protéines sont vraisemblablement produites par le syncytiotrophoblaste.

Chez la brebis et chez la vache, différents auteurs ont réalisé des broyats d'embryons ou de placentas pour immuniser des lapins en vue de l'obtention d'antisérums.

Ils se sont ensuite attachés à la mise au point de tests immunologiques permettant le diagnostic précoce de la gestation (Cerini et coll.,1976; Staples et coll.,1976).

Jusqu'à présent, les résultats de ces investigations ne sont guère concluants. La cause ,du moins partielle, de ces échecs, doit être recherchée dans le manque de pureté de ces préparations.

0.3. HORMONES STEROIDES

Durant la gestation et dans la plupart des espèces, le sang maternel renferme des concentrations élevées de stéroïdes. Ces derniers trouvent leur origine dans les glandes endocrines maternelles , dans le placenta et plus tard dans le fœtus.

Chez la femme, jusqu'aux environs de la 10^e semaine (Yoshimi et coll.,1969), le corps jaune, stimulé par l'hCG, constitue certainement la principale source d'hormones stéroïdes. Le placenta prend alors le relais et sécrète une grande quantité de progestérone. Cette dernière est éliminée dans l'urine sous forme de pregnandiol.

Le profil d'excrétion de ce stéroïde établi par Shearman (1959) et précisé par Jayle et coll.(1965), Jayle et Henry (1965) et Calliga et coll.(1965) montre une ascendance régulière depuis la 11^e ou 12^e semaine jusqu'au terme de la grossesse.

Des explorations systématiques du taux des oestrogènes ont été pratiquées durant la grossesse grâce aux dosages biologiques et radioimmunologiques. Ces recherches ont montré que le taux des oestrogènes du sang comme de l'urine s'élève

dès le début de la grossesse pour se stabiliser à l'approche du terme.

Le dosage de l'oestradiol plasmatique ou urinaire est fréquemment réalisé pour suivre l'évolution de la grossesse, quand un processus pathologique est à craindre, notamment dans les cas de toxémie de gestation ou de diabète maternel.

Chez la jument, le taux de la progestérone plasmatique augmente progressivement, pour atteindre un maximum vers le 60^e jour ; il diminue ensuite fortement, pour présenter une nouvelle augmentation durant le dernier mois de la gestation.

Le dosage de la progestérone, aux environs du 18^e - 20^e jour après la saillie, peut être intéressant comme moyen de diagnostic précoce de la gestation. Si la jument est gestante, le corps jaune cyclique se transforme en corps jaune de gestation, et le taux de progestérone plasmatique est élevé. Si au contraire, la jument n'est pas gestante, le corps jaune cyclique subit la lutéolyse et le taux de progestérone rejoint son niveau de base.

Le taux des oestrogènes plasmatiques augmente progressivement à partir de la 10^e semaine pour atteindre un maximum vers le 240^e jour, puis redescendre lentement jusqu'au moment de la parturition.

Le profil de l'excrétion urinaire des oestrogènes, détectables dès le 120^e jour, est à peu près identique.

Leur mise en évidence par des méthodes biologiques (Miller, 1935) ou fluorométriques (Gallot et Roussel, 1935; Cuboni, 1958) est utilisée comme méthode classique de diagnostic de gestation.

Chez la brebis, en début de gestation, la progestérone est sécrétée uniquement par le corps jaune, et ce n'est que vers le 50^e ou 70^e jour de la gestation que le placenta produit suffisamment de progestérone (Ricketts et Flint,1980) pour maintenir la gestation après ovariectomie (Casida et Warwick,1945).

Chez la vache,dès 1958,Short (1958a; 1958b) montre que durant la gestation, le taux de progestérone plasmatique reste assez constant, et que sa valeur ne dépasse guère celle d'un corps jaune cyclique soit 7 à 10 ng/ml.

La sécrétion de progestérone par le placenta commence tardivement car,pratiquée jusqu'au 150^e jour, l'ovariectomie interrompt la gestation (Mc Donald et coll.,1953).

De nombreux travaux ont été entrepris pour mettre en évidence les oestrogènes urinaires durant la gestation chez la vache.

Dans un premier temps, Lesbouyries et coll.(1937) et Berthelon (1937) ont testé sans grand succès différentes techniques biologiques.

Par la suite, de nombreux auteurs, parmi lesquels Arbib et D'Arches (1954) ont utilisé la technique colorimétrique de Kober(1931), mais leurs résultats ont été faussés par la présence de substances fluorescentes existant dans l'urine des ruminants. Toutes les tentatives entreprises en vue d'éliminer ces molécules, se sont soldées par des échecs (Bertrand et Ferney,1957).

En outre, selon Leclercq et Derivaux (1962) le taux des oestrogènes urinaires reste très faible durant toute la gestation chez la vache.

Récemment, par un dosage radioimmunologique, Heap et Hamon(1979a,1979b) ont détecté la présence de sulfate

d'oestrone dans le lait, dès le 40^e - 60^e jour après la fécondation. La confirmation de ces résultats pourrait ouvrir la voie à l'élaboration d'un moyen de diagnostic de gestation (Heap et Holdsworth, 1981).

0.4. HORMONES PRESENTANT UNE ACTIVITE SOMATOTROPE ET MAMMOTROPE

L'existence de ce type d'hormone est connue depuis longtemps. Dès 1933, Selye et coll. ont montré, chez le rat hypophysectomisé, entre le 10^e et le 14^e jour de la gestation, que la présence d'une fonction pituitaire intacte n'est pas nécessaire au maintien d'une gestation normale, ni au déroulement normal de la parturition, ni au déclenchement de la lactation. Par la suite, de nombreuses études furent réalisées. Nous nous limiterons cependant aux observations qui permettent de mieux introduire, et de mieux situer nos résultats expérimentaux.

0.4.1. HPL OU HCS

En 1961, Fukushima isole à partir du placenta humain, et par différentes méthodes de précipitation, une protéine douée d'une activité somatotrope, mise en évidence par le test de l'accroissement de l'épiphyse tibiale chez le rat hypophysectomisé.

L'année suivante, Josimovich et Mac Laren (1962) isolent probablement la même protéine mais ils lui reconnaissent surtout une activité prolactinique élevée. Cette protéine

présente une parenté immunologique importante avec l'hormone de croissance; elle peut être mise en évidence au moyen de tests immunologiques utilisant un antisérum antihormone de croissance.

Par la suite, cette hormone est purifiée par Kaplan et Grumbach (1964) ainsi que par Friesen (1965). Elle est caractérisée par Li et coll.(1971), Sherwood et coll.(1971), Niall et coll.(1971), Li et Dixon (1971).

La séquence définitive de l'hPL est établie par Li et coll. (1973).

Les études de ces derniers ont permis d'établir que la structure de l'hPL comprend 191 acides aminés et non 190 comme on le pensait auparavant.

Ainsi qu'il apparaît dans le tableau 1., un résidu valine occupe l'extrémité N.terminale tandis qu'un résidu phénylalanine se trouve en position C.terminale.

L'hPL comporte deux ponts disulfures intracaténaires entre les résidus cystéiniques occupant les positions 53 et 165 et ceux occupant les positions 182 et 189.

Mesuré par filtration sur gel et par osmométrie réalisée à un pH compris entre 3,6 et 8,4, le poids moléculaire de l'hPL correspond à une valeur de 21.600 ± 900 (Bewley et Li, 1971). Cependant, des formes de poids moléculaire plus élevé existent et correspondraient à des polymères (Andrews, 1969). De même, Schneider et coll.(1975) ont observé l'existence, dans des extraits placentaires et le sérum de femmes gravides, d'une forme d'hPL de poids moléculaire de 45.000. Cette forme d'hPL présente par conséquent un pic d'éluion, sur Sephadex G-100, plus précoce que celui de l'hPL monomérique, mais reste d'immunoréactivité semblable à celle de ce dernier. Cette agrégation, en cours de purification, des molécules d'hormone somato-mammotrope placentaire est probablement à l'origine d'une des diffi-

Tableau 1- COMPARAISON DES HOMOLOGIES EXTERNES DES STRUCTURES PRIMAIRES D'HCS, D'HGH ET D'HPRL (suite).

		80											90					
HCS	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu					
HGH	Lys	Ser	Asn	Leu	Gln	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu					
HPRL	Met	Asn	Gln	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Ser	Ile	Leu	Ile	Leu					
													100					
HCS	Ile	Glu	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Arg	Phe	Leu	Arg	Ser					
HGH	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser					
HPRL	x	Arg	Ser	Trp	Asn	Glu	Pro	Leu	Tyr	His	Leu	Val	Thr					
													110					
HCS	x	Met	Phe	Ala	Asn	Asn	Leu	Val	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asp					
HGH	x	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn					
HPRL	Glu	Val	Arg	Gly (Asx)	Gln	Glu	Ala	Pro	Glu	Ala	Ile	Leu						
													120			130		
HCS	Ser	Asp	Asp	Tyr	His	Leu	x	x	x	Leu	Lys	Asp	Leu					
HGH	Ser	Asp	Val	Tyr	Asp	Leu	x	x	x	Leu	Lys	Asp	Leu					
HPRL	Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Ile	Glu	Glu	Gln	Thr	Lys	Arg	Leu					
													140					
HCS	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp					
HGH	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp					
HPRL	Leu	Glu	Gly	Met	Glu	Leu	Ile	Val	Ser	Gln	Val	His	Pro					
													150					
HCS	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr					
HGH	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr					
HPRL	Glu	Thr	Lys	Glu	Asp	Glu	Ile	x	x	Tyr	Pro	Val	Trp					

Tableau 1- COMPARAISON DES HOMOLOGIES EXTERNES DES STRUCTURES PRIMAIRES D'HCS, D'HGH ET D'HPRL (suite).

		160												
HCS	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	x	Asn	Ser	His	Asn	His	Asp	Ala	
HGH	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	x	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	
HPRL	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Leu	Gln	Met	Ala	Asp	Glu	Ser	Glu	
		170							180					
HCS	Leu	Leu	Lys	Asn	x	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	
HGH	Leu	Leu	Lys	Asn	x	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	
HPRL	Arg	Leu	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Leu	His	Cys	Leu	Arg	
		190												
HCS	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Met	Val	
HGH	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	
HPRL	Arg	Asp	Ser	His	Lys	Ile	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Leu	Leu	
		200												
HCS	Gln	Cys	Arg	Ser	x	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe-OH		
HGH	Gln	Cys	Arg	Ser	x	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe-OH		
HPRL	Lys	Cys	Arg	Ile	Ile	His	Asn	Asn	Asn	Cys-OH				

La numérotation , des acides aminés, reprise dans le tableau, ne correspond à la séquence d'aucune de ces trois molécules: l'hGH et l'hCS comprennent 191 acides aminés, tandis que l'hPRL en comporte 198.

Pour mettre en évidence une homologie entre ces trois molécules, nous avons été obligés de ménager des intervalles en certains endroits de la séquence de l'une ou l'autre molécule. Ces espaces sont représentés par la lettre x.

cultés techniques rencontrées dans la caractérisation de ce type d'hormone.

Si l'hPL est comparée aux hormones hypophysaires humaines possédant le même type d'activité à savoir la prolactine et l'hormone de croissance, un certain nombre de similitudes de structure apparaissent.

L'hPL présente une structure très proche de celle de l'hormone de croissance hypophysaire.

La comparaison de leurs séquences complètes (tableau 1) permet de constater que 162 des 191 acides aminés constitutifs sont identiques et occupent les mêmes positions, portant à 84 % l'homologie de ces deux molécules. De plus, si l'on se réfère aux critères, de phylogénie des protéines, énoncés par Dayhoff (1972), 20 des 29 acides aminés restants, pourraient avoir subi des mutations génétiques ne s'accompagnant que de légères modifications des propriétés physico-chimiques de la molécule. Cette situation porterait l'homologie de l'hPL et de l'hGH à 95 %.

Il faut en outre signaler que dans les deux molécules, les ponts disulfures sont situés aux mêmes endroits, soit entre les acides aminés 53 et 165 et les acides aminés 182 et 189. Les peptides obtenus après digestion à la trypsine ont la même mobilité électrophorétique et le même comportement en chromatographie.

La structure tridimensionnelle de l'hPL paraît également, selon les renseignements partiels dont on dispose, très comparable à celle de l'hGH (Bewley et Li, 1971); toutes deux contiennent notamment environ 45 % de constituants α -hélicoïdaux (Aloj et Edelhock, 1971; Holladay et Puett, 1977).

L'hPL présente aussi certaines similitudes de structure avec la prolactine humaine dont la séquence a été établie plus récemment par Shome et Parlow (1977).

La prolactine est une holoprotéine constituée de 198 acides aminés (tableau 1), qui comporte 3 ponts disulfures intracaté-
naires entre les acides aminés 4 et 11, 58 et 173 ainsi que
190 et 198.

Si l'on compare les structures primaires de la prolactine
et de l'hPL, 48 acides aminés sont identiques et se retrouvent
en même position dans les deux hormones. De plus, 80 des 150
acides aminés restants peuvent, selon les critères énoncés
par Dayhoff, être considérés comme similaires parce qu'ils
auraient subi des mutations n'entraînant que de faibles modifi-
cations de leurs propriétés chimiques. Selon cette conception,
l'hPL et la prolactine humaine présentent donc 128 acides aminés
homologues. L'homologie maximale entre ces molécules est donc
de 64 %.

En conclusion, l'hPL semble beaucoup plus proche de
l'hormone de croissance (homologie de structure: 95 %) , que
de la prolactine humaine (homologie de structure :64 %).

Il est intéressant de mettre en relation ces consi-
dérations sur la similitude de structure de ces protéines avec
leur activité biologique.

L'activité somatotrope de l'hPL, dosée par le test
de l'accroissement de l'épiphyse tibiale (Greenspan et coll.,
1949) varie considérablement d'une préparation à l'autre, mais
elle reste toujours 40 à 400 fois plus faible que celle de
l'hormone de croissance hypophysaire.

La captation du ^{35}S et de la Thymidine ^3H par le cartilage
costal et la cellule adipeuse de rat hypophysectomisé augmente
proportionnellement à la concentration d'hPL, mais elle demeure
toujours inférieure à la captation produite par l'hormone de
croissance.

Dans un dosage de l'hormone de croissance humaine, par

liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires préparés à partir de tissu hépatique humain (Carr et Friesen, 1976), l'hPL présente une activité spécifique environ 200 fois plus faible que celle de l'hormone de référence (hGH). Ce système de dosage est très spécifique vis-à-vis de l'hormone de croissance humaine; en effet, ni les hormones somatotropes d'autres espèces (ovine, bovine), ni la prolactine (humaine, ovine) n'interfèrent dans cette liaison.

Les activités lactogénique et mammotrope de l'hPL ont été précisées par le test du jabot de pigeon et par le test de stimulation d'explants de glande mammaire, maintenus en culture (Josimovich et Mac Laren, 1962; Friesen,1965); l'hPL présente une activité spécifique lactogénique et mammotrope à peu près équivalente à celle de la prolactine.

Les résultats du dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires (Shiu et coll.,1973) sont en concordance avec ces observations.

Ces études comparatives sont réalisées *in vitro* ou sur animaux de laboratoire; elles semblent cependant montrer que l'activité prolactinique spécifique de l'hPL est approximativement 50 fois supérieure à son activité spécifique somatotrope.

L'activité métabolique de l'hPL paraît revêtir une grande importance : elle s'exerce sur le métabolisme glucidique, lipidique et azoté.

Bien que dépourvue d'activité hyperglycémiant directe, l'hPL contrecarre l'effet hypoglycémiant de l'insuline exogène (Beck,1970; Beck et Daughaday,1967).

En outre, Malaisse et coll.(1969) ont montré que le prétraitement de rats hypophysectomisés au moyen d'hPL produit une augmentation de la sécrétion de l'insuline. Cette

expérience montre que l'hPL pourrait avoir un effet stimulant sur l'activité sécrétoire des îlots de Langerhans.

L'hPL entraîne une mobilisation et une libération des acides gras libres, tant *in vitro* qu'*in vivo* et, par voie de conséquence, une augmentation des corps cétoniques circulants. Toutefois, cette activité lipolytique et cétogène est beaucoup plus faible que celle de l'hormone de croissance.

Selon Leake et Burt (1969) l'hPL favoriserait également la lipogénèse en augmentant le métabolisme général du tissu adipeux.

Florini et coll.(1966) observent que l'administration d'hPL (4 à 16 mg/jour) ou d'hormone de croissance (0,2 mg/jour) aux rats hypophysectomisés augmente le nombre de ribosomes et l'activité protéosynthétique au niveau du muscle. Cette expérience démontre l'activité anabolisante de l'hPL.

Le contrôle de la sécrétion de l'hPL serait essentiellement assuré par la glycémie : il est bien démontré ,en effet, que l'hypoglycémie augmente la sécrétion de l'hormone. Cependant, l'hyperglycémie provoquée ne réduit cette sécrétion que dans de faibles proportions (Gaspard,1980).

L'hPL est très vraisemblablement sécrétée au niveau du syncytiotrophoblaste ainsi que l'ont montré successivement Sciarra et coll.(1963); Beck et coll.(1969); de Ikonoff et coll.(1971); Sedlacek et coll.(1976); Watkins (1978) et Gaspard (1980).

Elle serait déjà présente dans le placenta dès le 12^e jour suivant la fécondation (Currie et coll.,1966).

Actuellement, le dosage de l'hPL se réalise essentiellement suivant la méthode radioimmunologique. De nombreux systèmes ont été décrits en détail (Grumbach et Kaplan,1964; Schalch et Parker,1964; Beck et coll.,1965).

L'hPL est détectable dans le sérum maternel dès la 5^e semaine d'aménorrhée. Sa concentration s'élève lentement jusqu'à la mi-gestation puis de manière accélérée, atteignant des pics de sécrétion vers la 36^e semaine. Durant cette période, le taux est en moyenne de 7 µg/ml, ensuite, il décroît très lentement et régulièrement jusqu'au moment de l'accouchement (Gaspard,1980).

0.4.2. oPL ou oCS

Dès 1972, en se basant sur la stimulation d'explants de glande mammaire, maintenus en culture, Buttle et coll. ont signalé l'existence dans le sérum de la chèvre gestante d'une hormone à activité prolactinique (Buttle et coll.,1972). Toutefois, ce système de détection ne permet pas de différencier l'activité de l'hormone placentaire de celle de la prolactine d'origine hypophysaire.

Plus tard, Kelly et coll.(1974) ont mis en évidence une activité prolactinique dans le sang périphérique de la brebis. Ces auteurs ont utilisé le dosage de la prolactine, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Ce système ne permet pas non plus de distinguer la prolactine hypophysaire de l'hormone placentaire.

L'hormone lactogène placentaire ovine a été purifiée par Fellows et coll.(1974); Martal et Djiane (1975); Martal et coll. (1975,1976); Chan et coll.(1976) et enfin par Reddy

et Watkins (1978a).

Cette hormone est une holoprotéine d'un poids moléculaire de 22.000 (électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS) cependant, la valeur de son point isoélectrique varie quelque peu suivant les préparations: 7,2 (Martal et Djiane,1975), 6,8 et 7,7 (Hurley et coll.,1977) ou encore 8,8 (Chan et coll., 1976).

D'après Fellows et coll. (1974) l'oPL serait constituée de 192 acides aminés. Sa structure comprendrait 3 ponts disulfures.

L'hormone lactogène placentaire ovine est vraisemblablement sécrétée par les cellules mono ou binucléées se trouvant au niveau des villosités placentaires (Martal et coll.,1977; Reddy et Watkins;1978b; Wooding,1981).

La migration de ces cellules, à travers la barrière placentaire, pourrait représenter un mécanisme normal de transport de l'oPL du foetus vers la mère; cette hypothèse a été émise par Steven et coll.(1978).

L'oPL présente des activités somatotrope, mammotrope et lactogène.

L'activité somatotrope a été évaluée par le test de l'accroissement de l'épiphyse tibiale et de la croissance pondérale du rat hypophysectomisé. L'oPL s'y révèle trois fois moins active que l'hormone de croissance.

Par contre, dans le dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires, elle présente une activité somatotrope équivalente à celle de l'hormone de croissance soit 0,8 UI/mg (Martal et Djiane, 1975;1977) ,soit 1,3 UI/mg (Chan et coll.,1976). Cette différence pourrait s'expliquer par le manque de spécificité du dosage de l'hormone de

croissance par liaison radiocompétitive aux récepteurs hépatiques de lapines. En effet, la prolactine et les hormones lactogènes placentaires interfèrent dans ce système.

L'activité prolactinique a été évaluée par le test de stimulation de la glande mammaire maintenue en culture. Dans ce test *in vitro*, l'oPL présente une activité équivalente à celle de la prolactine. Ce résultat concorde avec celui obtenu dans le dosage de la prolactine par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires de lapine.

L'activité mammogénique et lactogénique mesurée *in vivo* sur brebis, préalablement traitées par la bromocryptine, est équivalente à celle de la prolactine (Martal, 1980).

L'activité métabolique de l'oPL n'a guère été étudiée jusqu'à présent.

L'oPL pourrait intervenir, par son action lipolytique dans l'étiologie de la toxémie de gestation chez la brebis (Martal, 1980).

La mise au point d'un dosage radioimmunologique spécifique a permis à différents auteurs de déterminer la concentration de l'oPL dans les différentes parties du placenta et dans le sérum de la brebis (Handwerger et coll., 1974, 1977; Martal et Djiane, 1977).

L'hormone est détectable dans le sang maternel dès le 50^e - 60^e jour de la gestation puis sa concentration s'élève régulièrement entre le 50^e et le 100^e jour après la fécondation, époque à laquelle est atteint le taux d'un $\mu\text{g/ml}$; niveau qui se maintient jusqu'au moment de la parturition (Chan et coll., 1978a; Robertson et coll., 1980).

0.4.3. BPL, BCS OU HPSM

Les connaissances actuelles à propos de l'hormone placentaire somato-mammotrope bovine* sont bien moins développées que celles acquises au sujet de l'hPL et de l'oPL.

En 1976, Buttle et Forsyth ont mis en évidence une activité lactogénique dans les cotylédons de vache, prélevés à partir du 36^e jour de la gestation et cultivés en présence d'explants de glande mammaire de souris.

Par contre, dans le sérum, ces mêmes auteurs ne trouvent aucune autre activité lactogénique que celle de la prolactine hypophysaire. Il faut toutefois noter que la sensibilité de la méthode basée sur la stimulation d'explants de glande mammaire est relativement faible, elle correspond approximativement à 70 ng de prolactine par ml de sérum.

En 1976 également, Bolander et Fellows ont purifié à partir du placenta une hormone protéique douée d'une activité mammotrope et somatotrope (bPL). Leur préparation est homogène mais très peu active biologiquement. Son poids moléculaire, déterminé par filtration sur gel en présence de chlorure de guanidine et de dithiothreitol est de 22.150 et son point isoélectrique est de 5,9

La mise au point d'un dosage radioimmunologique spécifique leur a permis de déterminer la concentration plasmatique

* Cette hormone est déjà connue sous le nom de " Bovine Placental Lactogen (bPL)" ou " Bovine Chorionic Somatomammotrophin (bCS)". Nous préférons l'appellation "Hormone Placentaire Somatotrope et Mammotrope (HPSM)" qui rend compte de la dualité de l'activité hormonale.

de l'HPSM chez la vache gestante (Bolander et coll.,1976). L'hormone n'apparaît que tardivement dans le sang maternel (160^e - 200^e jour) mais son taux s'élève rapidement pour atteindre des concentrations se situant aux environs d'un µg/ml au moment de la parturition.

D'autres équipes se sont intéressées à la purification et à la caractérisation de cette hormone, mais elles n'ont publié que des résultats partiels qui ne concordent pas avec ceux de Bolander et Fellows(1976).

Roy et coll. (1977) ont obtenu une préparation homogène dont le poids moléculaire est de ≈ 60.000 .

Dans les dosages par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires, cette hormone présente une activité somatotrope de 0,3 UI/mg et une activité prolactinique de 7 UI/mg.

Hayden et Forsyth (1979) ont purifié une protéine dont le point isoélectrique est de 5,3 et le poids moléculaire de 45.000. Leur préparation possède une activité équivalente à celle de la prolactine dans le test de stimulation de la glande mammaire.

Enfin, en 1980, Bremel et coll. ont isolé une hormone présentant un niveau d'activité élevé dans les dosages de la prolactine et de l'hormone de croissance par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Après électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, seule la bande correspondant à un poids moléculaire de 32.000 est active et se lie aux récepteurs.

Devant ces résultats qui nous paraissent discutables (Bolander et coll.,1976) ou divergents et incomplets (Roy et coll.,1977; Hayden et Forsyth,1979), nous

avons jugé intéressant de reprendre l'étude de l'HPSM.

Notre recherche a pour objectif l'isolement et la purification de l'HPSM de manière à disposer d'une préparation pure et très active, nous permettant de mettre au point un dosage radioimmunologique spécifique et sensible applicable à la détermination des concentrations sériques maternelle et foetale de l'hormone.

Pour mener à bien ces travaux, nous avons procédé en plusieurs étapes:

- choix et mise au point de méthodes susceptibles de mettre en évidence l'activité de l'HPSM dans les différentes fractions obtenues au cours de la purification;
- isolement et purification de l'hormone à partir du placenta (Beckers et coll.,1980);
- étude des propriétés physico-chimiques de la protéine purifiée;
- caractérisation de la liaison de l'HPSM radiomarquée, de l'HPSM purifiée et de l'HPSM native, aux récepteurs membranaires de lapine gestante (Beckers et Ectors,1981);
- mise en évidence et caractérisation partielle de sites récepteurs somatotropes et prolactiniques au niveau de différents tissus prélevés chez la vache;
- mise au point d'un dosage radioimmunologique spécifique et sensible;
- détermination des concentrations en HPSM des cotylédons trophoblastiques et utérins, des liquides amniotiques et allantoïdiens, ainsi que des sérums foetaux et maternels (Beckers et coll.,1982).

CHAPITRE I

1. CHOIX ET MISE AU POINT DES METHODES PERMETTANT DE REPERER L'ACTIVITE HORMONALE DE L'HPSM.

1.1. INTRODUCTION

Le dosage ou du moins le repérage, de l'activité de l'hormone recherchée dans les différentes fractions, produites par les méthodes de séparation, augmente les chances de succès d'une purification, entreprise à partir d'un extrait contenant de nombreuses protéines différentes.

Les travaux de Bolander et Fellows(1976) ainsi que ceux de Kelly et coll. (1976) ont montré que l'hormone placentaire somato-mammotrope bovine possède une activité biologique bifonctionnelle (prolactinique et somatotrope). Cette caractéristique se retrouve également pour les hormones équivalentes isolées chez d'autres espèces, humaine et ovine notamment.

La mise en évidence d'une activité hormonale peut en principe faire appel à diverses techniques: biologiques, radio-immunologiques ou basées sur une liaison radiocompétitive aux sites de fixation membranaires.

Les dosages biologiques de la prolactine et de l'hormone somatotrope suivant les techniques de Lyons et Page (1935) ainsi que d'Evans et coll. (1943), permettent la mise en évidence des deux activités de l'hormone placentaire apparentée. Cepen-

dant la complexité de leur réalisation rend ces dosages inadéquats si l'on veut suivre l'enrichissement de l'hormone au cours des différentes manipulations qu'exige son isolement; nous ne les avons donc pas retenus.

Les dosages radioimmunologiques de la prolactine et de l'hormone de croissance bovines sont très spécifiques des hormones hypophysaires et ne permettent pas de repérer, dans cette espèce, l'hormone placentaire.

La méthode de dosage, par liaison radiocompétitive aux sites de fixation membranaires, a retenu notre attention car elle présente les avantages du dosage radioimmunologique sur le plan de la facilité et de la rapidité d'exécution, tout en restant suffisamment proche du dosage biologique, par son principe.

Les dosages, par liaison radiocompétitive aux sites de fixation membranaires, reposent sur l'organisation d'une compétition entre l'hormone radiomarquée et l'hormone native — ou non radioactive encore dite *froide* — pour la liaison aux "récepteurs membranaires".

L'ensemble des données expérimentales et théoriques acquises à ce jour ont conduit à la définition d'une série de critères auxquels doit répondre l'interaction d'une substance biologiquement active avec ses récepteurs (Ketelslegers, 1982).

L'affinité de la réaction d'une drogue ou d'une hormone avec son récepteur doit être élevée. Ceci est en effet indispensable pour permettre une occupation significative des récepteurs aux très faibles concentrations auxquelles la plupart des substances pharmacologiques et hormonales sont actives.

L'interaction entre une drogue ou une hormone et son récepteur doit être spécifique.

Les récepteurs d'une drogue ou d'une hormone doivent être localisés de façon spécifique au niveau des cellules cibles.

La réaction de la drogue ou de l'hormone avec ses sites récepteurs doit pouvoir être mise en corrélation avec une

réponse biologique de la cellule cible.

Pour nous conformer à l'appellation habituelle, nous utiliserons, tout au long de ce travail, le terme " récepteurs membranaires". Il est bien entendu que ce terme doit être pris dans le sens plus restrictif de sites de fixation (liaison) de l'hormone au niveau de la membrane cellulaire. En effet, nous n'avons pas fait la démonstration que la fixation de l'hormone entraînait un effet biologique spécifique.

Les performances du dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires sont limitées par la qualité des réactifs sur lesquels il repose: l'hormone radio-marquée et la préparation de récepteurs.

La première limitation provient de la difficulté, qu'il y a, de marquer les hormones par un radioisotope afin d'obtenir une radioactivité spécifique élevée sans entraîner de dénaturation. Conscients de ces difficultés, nous avons utilisé une méthode douce de marquage enzymatique selon Thorell et Johansson (1971). Malgré ces précautions, une fraction de l'hormone est dégradée et les diverses méthodes de séparation mises en oeuvre pour l'éliminer ne s'avèrent pas très efficaces. Lors de l'interprétation des résultats, il est, par conséquent, de la plus haute importance de tenir compte de cette fraction dégradée de l'hormone radiomarquée. La méthode, permettant de déterminer l'importance relative de cette fraction, sera développée ultérieurement.

La seconde limitation est inhérente à la difficulté technique d'isoler les récepteurs membranaires qui sont des molécules labiles et peu solubles.

Dans la plupart des cas, la préparation des récepteurs consiste en une homogénéisation du tissu cible de l'hormone, suivie de deux centrifugations destinées à augmenter au maximum la proportion de membranes cellulaires.

Le dosage d'une activité prolactinique associée à une activité somatotrope permet de repérer l'HPSM dans les extraits de cotylédons et dans les différentes fractions obtenues au cours de la purification.

Le dosage de la prolactine a été réalisé selon Shiu et coll.(1973), les récepteurs étaient préparés à partir de glandes mammaires prélevées sur des lapines en gestation avancée, ou ayant mis bas depuis peu de temps.

Le dosage de l'hormone de croissance a été effectué suivant la méthode de Tsushima et Friesen(1973); les récepteurs étaient préparés à partir du foie de lapine.

1.2. MATERIELS ET METHODES

1.2.1. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1.2.1.1. RADIOMARQUAGE DES HORMONES A L'IODE 125

Radiomarquage de la prolactine

La réaction s'effectue dans un tube de polystyrène (8 x 40 mm) dans lequel sont ajoutés successivement:

- 25 µg d'hormone (PRL-NIH-B4) diluée dans 25 µl de tampon phosphate sodico-potassique 0,05 M; pH 7,5;
- 25 µg de tampon phosphate sodico-potassique 0,5 M; pH 7,5;
- 10 µl de NaI 125 correspondant à 1 mCi (Amersham IMS 30);
- 10 µl de lactoperoxydase (0,5 µg) Boehringer (160 U/mg), diluée en tampon phosphate sodico-potassique 0,05 M; pH 7,5;
- 5 µl d' H_2O_2 (perhydrol Merck) à la concentration de 1/30.000;
- agitation modérée de la solution pendant 2 minutes;

- seconde addition de 5 μ l d' H_2O_2 à 1/30.000;
- nouvelle agitation pendant 2 minutes;
- chargement du milieu de marquage sur une colonne (1 x 35 cm) de Sephadex G-75 (Pharmacia) équilibrée en tampon Tris-HCl 0,025 M; $MgCl_2$ 0,01 M ; pH 7,5 contenant 0,1 % bSA (fraction V de Cohn).

L'élution de la colonne est réalisée au moyen du même tampon et l'éluat est collecté en fractions d'un ml qui sont immédiatement diluées 10 fois.

La radioactivité de chaque fraction est déterminée au moyen d'un compteur γ , puis l'hormone est diluée et congelée à $-20^\circ C$.

Seules les fractions centrales du pic d'élution des protéines, sont utilisées pour les dosages.

Radiomarquage de l'hormone de croissance

L'hormone de croissance est solubilisée à pH alcalin puis le radiomarquage s'effectue exactement de la même manière que pour la prolactine.

La chromatographie de l'hormone radiomarquée laisse apparaître régulièrement un premier pic correspondant à des molécules de poids moléculaire élevé. Il s'agit de fractions contenant une proportion importante d'hormone dénaturée et probablement agglomérée. Nous avons observé que ces dernières ne se lient que très faiblement aux récepteurs.

1.2.1.2. PREPARATION DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES

Traitement des lapines

Les glandes mammaires ont été prélevées sur des lapines, en fin de gestation ou venant de mettre bas. Ces lapines sont traitées par 3 injections de 2 mg de bromo-

cryptine* réalisées 36,24 et 12 heures avant le prélèvement.

La bromocryptine, tout comme la dopamine, inhibe la sécrétion et la libération de la prolactine par l'hypophyse et de ce fait exerce un effet de désaturation des récepteurs (Djiane et coll., 1977); c'est la raison pour laquelle nous l'avons systématiquement utilisée dans le but d'augmenter la concentration des sites de fixation au niveau de la glande mammaire de lapine.

La Bromocryptine a été solubilisée de la manière suivante: 20 mg de Bromocryptine et 20 mg d'acide lactique sont dissous par addition, goutte à goutte, d'alcool à 70%. Cette solubilisation est effectuée dans un bécher de 15 ml, sous agitation constante et en chauffant légèrement. La solution est diluée jusqu'à une concentration de 2 mg/ml au moyen de NaCl 9 ‰, puis elle est stockée à 4°C, à l'obscurité et à pH inférieur ou égal à 7.

Prélèvement des tissus.

Directement après l'euthanasie des lapines, les glandes mammaires et le foie sont prélevés, disséqués, divisés en fragments de 2,5 g et stockés à -50°C.

Production de la suspension tissulaire de récepteurs.

Les opérations, réalisées en maintenant la température aux environs de 0°C., peuvent se résumer comme suit:

a) homogénéisation: le tissu est placé dans un tube de 50 ml,

* Nous remercions le Professeur Flückiger de la firme Sandoz, Bâle, qui nous a fourni gracieusement la Bromocryptine.

- additionné de 12,5 ml de sucrose 0,3 M et homogénéisé au moyen d'un broyeur mécanique de type Ultra-Turrax (20.000 tpm), pendant 10 secondes. L'opération est répétée six fois en remplaçant chaque fois le tube dans le bain d'eau glacée de manière à éviter tout réchauffement de la suspension;
- b) filtration et centrifugation : le broyat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze puis centrifugé à 15.000 g, pendant 20 minutes à 4°C;
- c) récolte du surnageant: le surnageant est repris puis soumis à une nouvelle centrifugation à 35.000 g pendant 5 heures à 4°C;
- d) élimination du surnageant: le surnageant est éliminé avec précaution;
- e) récolte du culot: le culot est repris et homogénéisé au moyen d'un broyeur en verre de type Dounce (508 μ);
- f) détermination de la teneur en protéines; la concentration en protéines de la suspension est déterminée selon la technique de Lowry et coll. (1951) après solubilisation par traitement de 30 minutes, au moyen de sodium dodécyl sulfate à la concentration de 75 μ g/ml;
- g) répartition et stockage: la suspension de récepteurs, diluée à raison de 15 mg de protéines/ml est répartie par fractions d'un ml et congelée à -20°C.

1.2.2. DOSAGES

1.2.2.1. DOSAGE DE LA PROLACTINE

Le dosage, de la prolactine, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires, est réalisé en tubes de polystyrène de 13 x 70 mm selon la méthode de Shiu et coll. (1973), modifiée de la manière suivante:

- un tampon Tris-HCl 0,025 M; MgCl₂ 0,01 M; pH 7,6; 0,1 % BSA; 0,01 % de sulfate de néomycine est utilisé pour toutes les dilutions;

- le volume d'incubation est de 500 μ l;
- les réactifs sont ajoutés dans l'ordre suivant:
- 100 μ l de standard de référence ou d'extrait à doser;
- 200 μ l de tampon;
- 100 μ l d'hormone radioactive (traceur) correspondant à 15.000 cpm;
- 100 μ l de la suspension de récepteurs correspondant à une concentration de 125 μ g de protéines. Cette quantité de récepteurs est choisie de façon à lier \approx 25 % de l'hormone radiomarquée;
- incubation durant 16 à 20 heures à température ambiante ou durant 1 heure à 37°C;
- addition à tous les tubes de 3 ml de tampon froid (4°C);
- centrifugation immédiate à 2.000 g pendant 20 minutes à 4°C;
- élimination du surnageant;
- lavage du culot par 3 ml de tampon froid et nouvelle centrifugation;
- après élimination du surnageant, détermination de la radioactivité au moyen d'un compteur de scintillation gamma, possédant une efficacité de 65 %.

1.2.2.2. DOSAGE DE L'HORMONE DE CROISSANCE

Le dosage de l'hormone de croissance est réalisé suivant la méthode de Tsushima et Friesen (1973). Afin d'uniformiser les méthodes et de réaliser les dilutions dans un même tampon, le chlorure de calcium est remplacé par du chlorure de magnésium. Cette modification ne diminue pas la qualité des résultats.

1.2.3. DÉFINITIONS DES PARAMÈTRES DES DOSAGES PAR LIAISON RADIOCOMPETITIVE AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES

1.2.3.1. RADIOACTIVITE TOTALE (T)

La radioactivité totale correspond à la quantité d'hormone radiomarquée ajoutée à tous les tubes du dosage. Bien que ce paramètre puisse être défini en terme de concentration (M) ou en unité de poids (pg), nous préférons l'exprimer par la mesure de radioactivité (cpm) déterminée au moyen d'un compteur à scintillation gamma.

1.2.3.2. LIAISON TOTALE (B_T)

Au terme de l'incubation de l'hormone marquée en présence de la suspension de récepteurs, soit 16 heures à 20°C, les fractions d'hormone libre et liée sont séparées et la radioactivité de la fraction liée est déterminée au moyen d'un compteur de scintillation gamma.

1.2.3.3. LIAISON NON SPÉCIFIQUE (NSB)

Au cours de l'incubation de l'hormone radiomarquée et de la suspension de récepteurs membranaires, une fraction de l'hormone se lie spécifiquement aux récepteurs tandis qu'une autre peut se lier à la surface du tube et à des particules de l'homogénat tissulaire. Cette liaison est dite non spécifique ou aspécifique (NSB).

Elle est déterminée en incubant, la suspension de récepteurs en présence d'une faible quantité d'hormone radioactive et d'une concentration très élevée d'hormone "froide" (1 µg). Ainsi l'hormone "froide" - présente en concentration plus de 1.000 fois supérieure à celle de l'hormone radiomarquée - sature préférentiellement tous les sites de liaison spécifique. En fin d'incubation (16 heures à 20°C) les fractions libre et

liée sont séparées et la radioactivité du culot est déterminée. Celle-ci correspond à la liaison non spécifique - de l'hormone radioactive- aux parois du tube et à la surface des particules tissulaires. Cette liaison non spécifique peut être exprimée en cpm ou mieux en pourcentage de la quantité d'hormone radioactive ajoutée au milieu (T).

1.2.3.4. LIAISON SPECIFIQUE (B)

La liaison spécifique correspond à la liaison totale (B_T) dont on soustrait la liaison non spécifique ($B = B_T - NSB$). Elle est le plus souvent exprimée en pourcentage de la radioactivité totale ajoutée au milieu B/T.

La liaison spécifique mesurée en absence d'hormone "froide", dans le milieu, est représentée par B_0 . Les liaisons spécifiques mesurées en présence d'hormone "froide" seront généralement rapportées au B_0 et exprimées en pourcentage de celui-ci.

1.2.3.5. CAPACITE MAXIMALE DE LIAISON DE L'HORMONE RADIO-MARQUEE: (B_{max}/T).

La capacité maximale de liaison est déterminée en incubant, pendant 16 heures à 20°C, une faible quantité d'hormone radioactive (≈ 15.000 cpm), en présence de quantités croissantes de suspension de récepteurs. Passé ce délai, les différentes fractions sont séparées et la radioactivité spécifiquement liée est déterminée.

Le pourcentage d'hormone radioactive liée augmente progressivement en fonction de la quantité de récepteurs. A partir d'une concentration suffisante en récepteurs, elle atteint un maximum. Dans certains cas, elle décroît ensuite lentement. Cette diminution de liaison spécifique, en présence d'un large excès de récepteurs, s'explique par les phénomènes de dégradation des récepteurs et de l'hormone libre, en cours d'incubation.

Dans le cas de la liaison aux récepteurs membranaires de lapine, nous avons cependant observé que cette dégradation reste faible; elle peut dès lors être considérée comme négligeable.

1.2.3.6. FRACTION INTACTE DE L'HORMONE RADIOMARQUEE (FI)

Dans la mesure où l'on peut exclure les phénomènes de dénaturation, la "fraction intacte" de l'hormone radioactive peut être assimilée à sa capacité maximale de liaison. L'estimation de la "fraction intacte" de l'hormone radiomarquée est importante car il faut en tenir compte pour déterminer les concentrations réelles en hormone à l'équilibre. En effet, lorsque les récepteurs sont incubés, par exemple, en présence de 100.000 cpm d'hormone radiomarquée, si la "fraction intacte" du "traceur" est de 45%, ces récepteurs sont en réalité en présence de 45.000 cpm d'hormone radioactive réellement capable de se lier.

1.2.3.7. RADIOACTIVITE SPECIFIQUE (RS)

L'appréciation du rendement de marquage qui devrait servir de base au calcul de la radioactivité spécifique est malaisée. En effet, une partie de l'hormone est retenue dans la colonne lors de la chromatographie qui suit le marquage. De plus, cette méthode déterminerait la radioactivité spécifique moyenne de toute l'hormone radioactive. Or on sait qu'une partie seulement de l'hormone radiomarquée, soit la "fraction intacte" du "traceur", est capable de se lier aux récepteurs. C'est donc la radioactivité spécifique de cette population de molécules marquées et capables de se lier aux récepteurs qu'il importe de déterminer.

C'est pourquoi, nous avons calculé la radioactivité spécifique de l'hormone radiomarquée par la méthode d'"auto-inhibition", réalisée dans les conditions expérimentales du dosage, par liaison radiocompétitive, lui-même. Cette méthode, décrite en radioimmunologie par Gocke et coll. (1969), Hunter (1971), Roulston (1979) et adaptée par Ketelslegers et coll. (1974) aux dosages, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires, comporte les étapes suivantes:

- Etablissement de la courbe d'inhibition (courbe standard) de la liaison de l'hormone radioactive par l'hormone "froide"

Une faible concentration d'hormone radioactive (≈ 15.000 cpm) est incubée avec la préparation de récepteurs en présence de quantités croissantes d'hormone "froide".

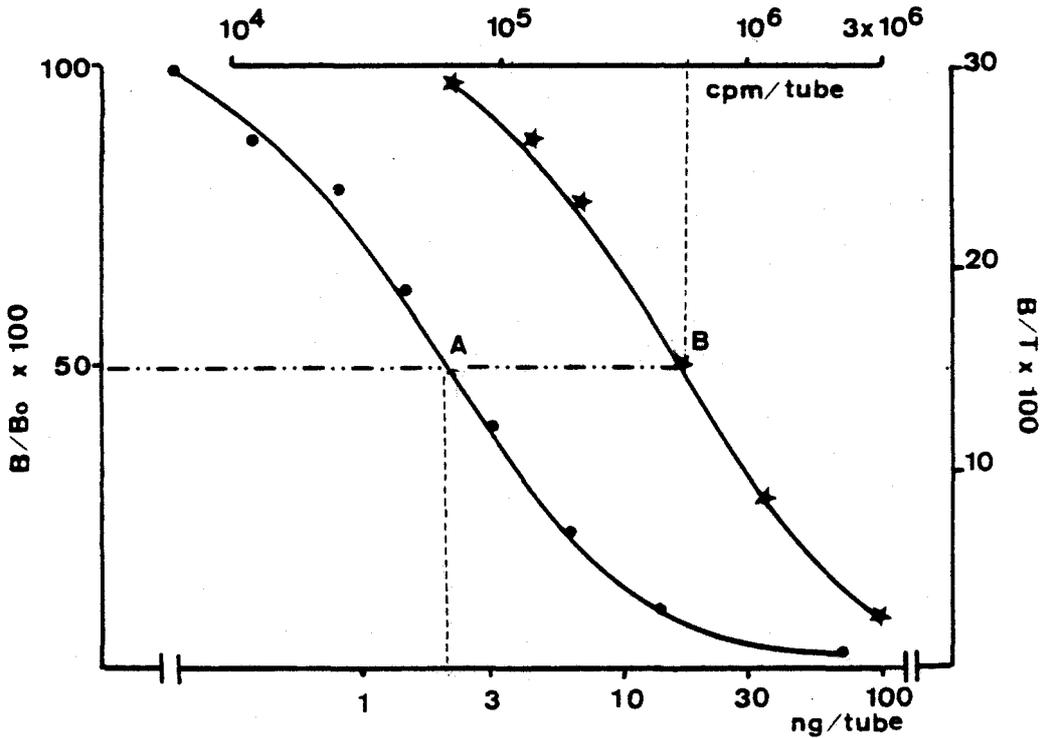
L'hormone radiomarquée et l'hormone "froide" entrent en compétition pour la liaison aux récepteurs et, de ce fait, la quantité d'hormone radioactive, liée en fin d'incubation, est d'autant plus faible que la concentration en hormone "froide" est plus élevée.

Le rapport B/T entre la radioactivité liée et la radioactivité totale est calculé au terme de l'incubation. La courbe standard (d'inhibition) est établie en portant, en ordonnée, le rapport de la radioactivité totale et, en abscisse, le logarithme de la quantité d'hormone "froide" ajoutée dans le milieu. (Fig.2, courbe A).

- Etablissement de la courbe d'"auto-inhibition" de la fixation de l'hormone radiomarquée aux récepteurs.

Des quantités croissantes d'hormone radiomarquée sont incubées avec la préparation de récepteurs. Ce phénomène peut être représenté sous forme d'une courbe d'"auto-inhibition" (Fig.2, courbe B) en portant en ordonnée le rapport B/T et en abscisse le logarithme de la différence entre la radioactivité totale ajoutée à chaque tube et la radioactivité (15.000 cpm par tube) utilisée dans

Fig.2 - DÉTERMINATION DE LA RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE L'HORMONE RADIOMARQUÉE.



Courbe A: courbe d'inhibition - de la liaison - par l'hormone froide.

Courbe B: courbe d' auto-inhibition - de la liaison - par l'hormone radioactive.

l'établissement de la courbe standard d'inhibition (courbe A). La base de cette représentation est donc de considérer une partie de l'hormone radioactive (15.000 cpm) - ajoutée à tous les tubes - comme " traceur" et le reste de la radioactivité (variable pour chaque tube) comme hormone inhibitrice de la fixation, de la radioactivité, aux sites de liaison.

Si l'hormone radiomarquée a conservé les mêmes propriétés de liaison - aux récepteurs - que l'hormone " froide", les courbes A et B doivent être parallèles en représentation logit. La comparaison des deux courbes permet de déterminer la radioactivité spécifique de l'hormone radiomarquée ou plutôt l'équivalence entre une quantité d'hormone radioactive (cpm par tube) et une quantité d'hormone "froide" (ng par tube), possédant l'une et l'autre un même effet d'inhibition de la liaison - d'une quantité fixée (15.000 cpm) d'hormone radioactive - dans le système expérimental même où sera utilisée cette hormone radioactive.

Lee et Ryan (1973) comparaient les courbes d'inhibition obtenues en incubant avec les récepteurs des quantités croissantes d'hormone "froide" ou d'hormone marquée par l' ^{125}I et en utilisant en tant que "traceur" une faible quantité d'hormone marquée par un autre isotope radioactif (l' ^{131}I , par exemple). Cette méthode présente l'inconvénient par rapport à la méthode d'"auto-inhibition" utilisée ici, d'imposer deux radiomarquages.

La radioactivité spécifique d'une hormone peut varier d'un marquage à l'autre. Il importe donc de la déterminer pour chaque "traceur" utilisé dans une caractérisation de la liaison hormone-récepteurs.

Dans l'exemple repris dans la Fig.2; 2,15 ng d'hormone "froide" correspondent à 500.000 cpm d'hormone radiomarquée. La radioactivité spécifique de l'hormone radiomarquée est donc de 232.500 cpm/ng ou 190 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ou encore $\approx 6 \mu\text{Ci}/\text{pmole}$.

1.2.4. CARACTÉRISTIQUES DES PRÉPARATIONS HORMONALES

Pour mettre au point ces dosages, nous avons utilisé des préparations de prolactine et d'hormone de croissance bovines, que nous a fournies gracieusement le NIH. Le choix d'hormones - hypophysaires - bovines se justifie du fait que notre recherche porte sur une hormone - placentaire-bovine également.

1.2.4.1. bPRL-NIH-B4

Déterminée suivant la méthode de Riddle et coll. (1933) l'activité biologique spécifique de cette préparation de prolactine bovine est de 18,5 UI/mg *

Déterminée suivant la méthode de Marx et coll.(1942) modifiée par Parlow et coll.(1965), sa contamination en hormone de croissance (son activité somatotrope spécifique) est inférieure à 0,01 UI/mg* .

1.2.4.2. bGH-NIH-B18

Déterminée suivant la méthode de Marx et coll.(1942), modifiée par Parlow et coll.(1965), l'activité biologique spécifique de cette préparation d'hormone de croissance bovine est de 0,81 UI/mg* .

Déterminée suivant la méthode de Riddle et coll.(1933), sa contamination en prolactine (son activité prolactinique spécifique) est inférieure à 0,5 UI/mg* .

* Données fournies par le NIH.

1.3. RESULTATS

1.3.1. DOSAGE DE LA PROLACTINE

Le dosage de la prolactine, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires mammaires de lapines gestantes, s'est avéré sensible (0,75 ng/tube) et spécifique (Fig.3).

L'hormone de croissance (bGH-NIH-B18) n'interfère que par sa contamination en prolactine (confer 1.2.4.,page 45).

La *fraction intacte* de l'hormone radioactive varie quelque peu d'un marquage à l'autre, mais sa valeur reste toujours suffisante (35 à 50%).

1.3.2. DOSAGE DE L'HORMONE DE CROISSANCE

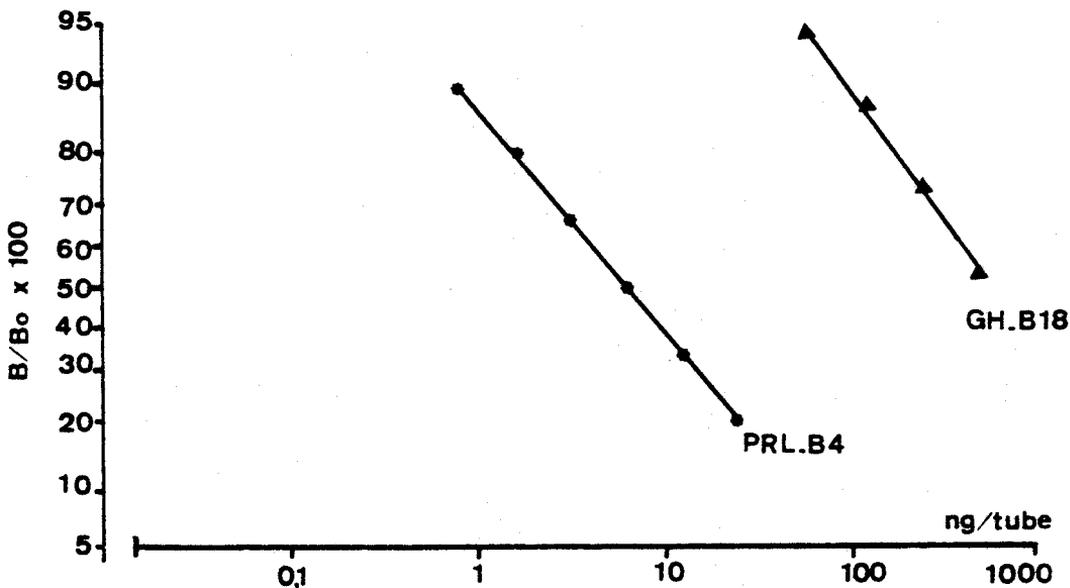
Le dosage de l'hormone de croissance, par liaison radiocompétitive aux récepteurs hépatiques de lapine gestante est sensible (0,18 ng/tube; Fig.4).

Cependant, ce système manque de spécificité; la prolactine entre en compétition, de manière importante, avec l'hormone de croissance (radioactive) pour l'occupation des récepteurs hépatiques. Cette interférence est de loin supérieure à la contamination de la préparation de prolactine (bPRL-NIH-84) en hormone de croissance (confer 1.2.4., page 45).

1.4. DISCUSSION

Cette étape de notre recherche avait pour but, le choix et la mise au point de méthodes permettant de

Fig.3 - DOSAGE DE LA PROLACTINE PAR LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE.



Conditions: - 100 μ l de prolactine radioactive correspondant à 15.000 cpm (T);
- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 120 μ g de protéines (Lowry SDS);
- volume d'incubation: 500 μ l;
- conditions d'incubation: 16 heures à 20°C.

Caractéristiques: NSB = 440 cpm \approx 3 %; Bo/T \approx 22 %; Bmax/T \approx 46%

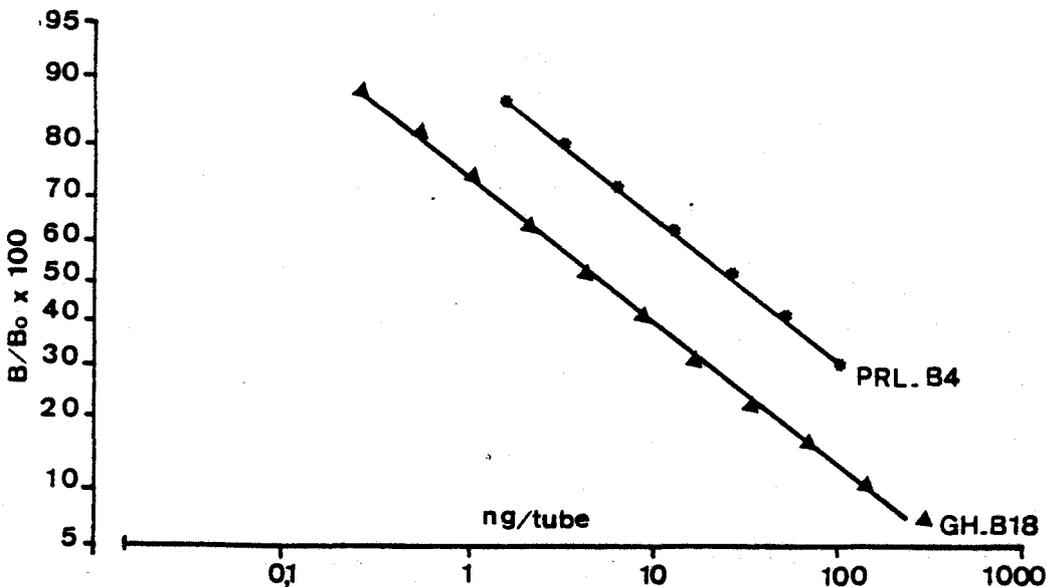
En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle logit) B/Bo x 100.

● = prolactine, bPRL-NIH-B4.

▲ = hormone de croissance, bGH-NIH-B18.

Fig.4 - DOSAGE DE L'HORMONE DE CROISSANCE PAR LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES HÉPATIQUES DE LAPINE GESTANTE.



Conditions: - 100 μ l d'hormone radiomarquée correspondant à 15.000 cpm (T);
- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 100 μ g de protéines (Lowry SDS);
- volume d'incubation: 500 μ l;
- conditions d'incubation: 16 heures à 20°C.

Caractéristiques: NSB = 500 cpm \approx 3,3 %; $B_0/T \approx 19$ %; $B_{max}/T \approx 39$ %.

En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone *froide*, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle logit) $B/B_0 \times 100$.

▲ = hormone de croissance, bGH-NIH-818.

* = prolactine, bPRL-NIH-84.

repérer l'activité hormonale de l'HPSM, au cours des différentes étapes de la purification. Notre choix s'est porté sur les dosages de la prolactine et de l'hormone somatotrope par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Etant donné que ces méthodes devaient être reproduites un grand nombre de fois, nous en avons optimisé les conditions.

La préparation des réactifs a fait l'objet d'un soin particulier; dans ces conditions cependant, elle s'est avérée reproductible.

Notamment en ce qui concerne les hormones radioactives, nous avons observé une capacité maximale de liaison toujours satisfaisante (prolactine 35 à 50 %; hormone de croissance 30 à 45 %). La valeur plus faible de la capacité maximale de liaison, dans les dosages par liaison aux récepteurs membranaires que dans les dosages radioimmunologiques, confirme la stabilité relative des propriétés immunologiques des hormones polypeptidiques et la plus grande fragilité de leur capacité de liaison aux récepteurs.

Nos tentatives de remplacer les récepteurs mammaires de lapines gestantes par des récepteurs mammaires de vaches ont été rapidement abandonnées. En effet, elles se sont traduites par l'obligation d'utiliser une quantité importante de suspension de récepteurs (\approx 1 à 1,5 mg/tube) pour observer une liaison mesurable. Dans ces conditions, la liaison non spécifique est très élevée (8 à 12 %) et diminue la précision du dosage.

L'interférence de la prolactine dans le dosage de l'hormone de croissance est relativement importante et peut varier selon la préparation de récepteurs, probablement en fonction de l'état physiologique de la lapine sur laquelle a été prélevé le foie.

L'observation d'une interférence de la prolactine dans le dosage de l'hormone de croissance — par liaison radiocompétitive

aux récepteurs hépatiques de lapin - a été relevée également par Posner et coll. (1974), Gerasimo et coll. (1979) et par Hughes (1979).

Dans le cadre de notre recherche, cependant, cette interférence de la prolactine dans le dosage de l'hormone de croissance n'était pas gênante du fait que l'HPSM présente intrinséquement ces deux types d'activités hormonales.

Grâce à leur réalisation simple et rapide, ces techniques de dosage - par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires - nous ont permis d'entreprendre l'isolement et la purification de l'HPSM dans des conditions favorables.

CHAPITRE II

2. ISOLEMENT DE L'HORMONE

2.1. INTRODUCTION

Au moment d'entreprendre la purification de l'HPSM, nous nous sommes interrogés sur l'opportunité de suivre la méthode décrite par Bolander et Fellows (1976). Nous y avons renoncé car ces auteurs préparent une poudre placentaire qu'ils traitent à pH acide et en présence de dithiothreitol. Or l'expérience que nous avons acquise au cours de la purification de la follitropine bovine (Beckers et coll., 1977), nous a appris qu'il est préférable de purifier les hormones protéiques en choisissant les méthodes les moins dénaturantes possibles, en assurant un déroulement rapide des opérations à la température de 4°C, en évitant, chaque fois que c'est possible la lyophilisation.

2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. EXTRACTION DE L'HORMONE

2.2.1.1. RECHERCHE DE LA PARTIE DU PLACENTA LA PLUS RICHE EN HORMONE.

Les utérus sont prélevés à l'abattoir, placés

immédiatement dans un bac de glace et ramenés au laboratoire dans les plus brefs délais.

Les différentes parties sont disséquées soigneusement de façon à recueillir séparément le liquide amniotique, le liquide allantoïdien, les cotylédons foetaux, les cotylédons maternels et le sang du foetus.

Préalablement au dosage, les cotylédons ont subi une extraction au moyen d'un tampon Tris-HCl 0,05 M; pH 7,6 dans un rapport poids/volume de 1/5.

L'activité hormonale est recherchée au moyen du dosage de la prolactine et de l'hormone somatotrope par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires.

Le dosage des protéines a été réalisé suivant la méthode de Lowry et coll. (1951) en utilisant l'albumine sérique bovine comme standard.

2.2.1.2. RECHERCHE DE L'EPOQUE DE LA GESTATION LA PLUS FAVORABLE POUR LE PRELEVEMENT.

Notre objectif fut alors de préciser l'époque de la gestation durant laquelle le placenta est le plus riche en hormone.

L'extraction et les dosages furent réalisés sur des cotylédons foetaux prélevés à différents moments de la gestation, à partir du 2^e - 3^e mois de celle-ci.

2.2.1.3. RECHERCHE DU PROCEDE OPTIMAL D'EXTRACTION

Les conditions optimales d'extraction furent déterminées en faisant varier la nature et le pH du tampon ainsi que le nombre et la durée des extractions.

Ces expériences sont résumées dans le tableau 2.

2.2.1.4. DEVELOPPEMENT DU PROCEDE D'EXTRACTION

Après en avoir précisé les conditions

Tableau 2 - RECHERCHE D'UN PROCÉDÉ D'EXTRACTION EFFICACE.

Procédé n°	Nbre d'extractions	Tampon A			Tampon B		
		Nature	M	pH	Nature	M	pH
1	1	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,1	5	-	0,1	-
2	2	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,1	5	NH_4HCO_3	0,1	9,5
3	2	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,1	6	NH_4HCO_3	0,1	9,5
4	2	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,1	6	NH_4HCO_3	0,1	10,5
5	2	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,1	6,5	NH_4HCO_3	0,1	9,5
6	1	NH_4HCO_3	0,1	9,5	-	0,1	-
7	2	NH_4HCO_3	0,1	9,5	NH_4HCO_3	0,1	9,5

optimales, nous avons réalisé cette étape de la manière suivante:

- toutes les opérations sont effectuées à 4°C;
- dissection soigneuse de trois à cinq kilos de cotylédons foetaux;
- lavage avec une solution de NaCl 9 ‰, pour éliminer le sang;
- broyage dans une machine à hacher la viande;
- homogénéisation dans un broyeur de type Sorvall (1,2 litre), vitesse 12.000 tpm pendant 30 sec.;
- extraction en tampon NH_4HCO_3 0,1 M ajusté à pH 9,5 avec du NH_4OH dans un rapport poids/volume de 1/5;
- agitation de la suspension durant 16 heures;
- centrifugation à 13.000 g pendant 40 minutes;
- récolte du liquide surnageant après avoir écarté les matières grasses.

2.2.2. PRÉCIPITATION DES PROTÉINES AU SULFATE D'AMMONIUM

Afin de choisir les meilleures conditions de précipitation de l'hormone, nous avons testé des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium étalées entre 20 et 30 % de saturation.

Les premiers essais nous ont permis de préciser les conditions les plus favorables pour la précipitation de l'hormone. La précipitation au sulfate d'ammonium se déroule comme suit:

- le liquide surnageant provenant de l'extraction est additionné lentement et sous agitation continue, de sulfate d'ammonium en poudre jusqu'à l'obtention d'un taux de saturation de 35 %, soit 209 g/litre;
- le milieu est ensuite laissé au repos pendant 4 heures;
- les protéines précipitées sont écartées par centrifugation (10.000 g / 30 minutes);
- le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium de manière

- à atteindre 65 % de saturation, soit 200 g/litre;
- après dissolution complète du sel, la solution est abandonnée telle quelle durant 16 heures puis elle est centrifugée à 10.000 g pendant 30 minutes;
- le surnageant est éliminé et le précipité est solubilisé dans un volume d'environ 4 litres de tampon NH_4HCO_3 0,06 M; pH 9,5 pour 5 kg de cotylédons. La concentration en protéines de cette solution est approximativement de 10 mg par ml;
- la solution est dialysée dans des membranes Visking tubing (Union Carbide) de 20 x 300 mm contre un volume de 20 litres de tampon renouvelé 5 fois à 5 heures d'intervalle;
- après dialyse, la solution est centrifugée à 27.000 g pendant 120 minutes pour éliminer les protéines qui ont flocculé;
- l'activité hormonale et la concentration en protéines sont déterminées suivant les techniques décrites antérieurement.

2.2.3. PURIFICATION DES PROTÉINES PAR CHROMATOGRAPHIE

2.2.3.1. CHROMATOGRAPHIE SUR RESINE ECHANGEUSE D'ANIONS

Notre choix s'est porté sur le gel DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) plutôt que le gel DEAE-Sephadex A-50 parce qu'il permet une élution plus rapide des colonnes.

De ce fait, l'emploi de ce gel permet une réduction de la durée du traitement minimisant ainsi les risques de dénaturation de l'hormone.

Différents essais ont permis de préciser que l'importance du pH d'équilibration de la colonne n'est pas déterminante.

Les protéines sont éluées en augmentant la force ionique du tampon, soit par étapes, soit graduellement; la première méthode nous a paru plus efficace.

Les différentes manipulations peuvent se résumer comme suit: les protéines (50 à 60 g) diluées en tampon NH_4HCO_3 0,06 M; pH 9,5 sont chargées sur une colonne (10 x 20 cm) de DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia), préalablement équilibrée dans le même tampon.

Après le chargement, la colonne est lavée avec approximativement 20 litres de tampon jusqu'à ce que la densité optique de l'éluat déterminée à 280 nm soit inférieure à 0,08. Le volume récolté (\approx 25 litres) constitue la fraction I.

Ensuite, la force ionique du tampon est augmentée pour atteindre la molarité de 0,075 en NH_4HCO_3 à pH 9,5. La colonne est lavée avec environ 20 à 30 litres du nouveau tampon jusqu'à ce que la densité optique (280 nm) de l'éluat soit inférieure à 0,08. Le volume récolté (\approx 25 litres) constitue la fraction II.

La force ionique est à nouveau augmentée pour atteindre la molarité de 0,1 en NH_4HCO_3 à pH 9,5. La colonne est lavée jusqu'à ce que la densité optique (280 nm) soit inférieure ou égale à 0,08. Le volume récolté (\approx 35 litres) constitue la fraction III.

Enfin, un dernier tampon de force ionique plus élevée (NH_4HCO_3 0,1 M; pH 9,5 ; NaCl 0,3 M) est appliqué sur la colonne pour éluer le restant des protéines accrochées.

Les dosages des protéines totales et de l'activité hormonale sont effectués sur chaque fraction.

La fraction contenant le maximum d'hormone est concentrée au moyen d'une cassette Millipore (porosité de la membrane PM 10.000, surface 2.325 cm^2) jusqu'à un volume de 3 à 10 mg de protéines par ml.

2.2.3.2. CHROMATOGRAPHIE D'HYDROPHOBICITE

En fonction du degré d'hydrophobicité qu'elles présentent, les protéines se lient, avec une affinité

plus ou moins grande, à des radicaux "octyl" ou "phenyl", portés par un support insoluble tel que le Sepharose CL-4B. Après avoir essayé le gel Octyl-Sepharose CL-4B, dont les propriétés hydrophobes sont très accusées, nous avons retenu la chromatographie sur Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia).

Cette chromatographie se déroule de la manière suivante:

- l'extrait contenant l'activité hormonale et provenant de la colonne de DEAE-Sephadex A-25 (fraction III) est additionné de NaCl, à la concentration 0,1 M et de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jusqu'à la concentration 1 M;
- la solution est chargée sur une colonne de Phenyl-Sepharose CL-4B préalablement équilibrée dans le même tampon;
- le lavage est réalisé selon un gradient linéaire 2 x 2 litres où le tampon A est le tampon de chargement et le tampon B est constitué de NH_4HCO_3 0,1 M; NaCl 0,1 M; pH 9,5 dilué à 50 % dans de l'éthylène-glycol;
- l'éluat est récolté par fractions de 25 ml;
- la densité optique ainsi que l'activité hormonale sont déterminées sur chacune des fractions.

2.2.3.3. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR BLUE SEPHAROSE CL-6B

Pour tenter d'éliminer l'albumine contaminant la préparation d'HPSM, nous avons employé la technique de Travis et Pannell (1973,1974), qui utilisent la chromatographie sur Blue Sepharose CL-6B. Cependant, dans les conditions décrites par ces derniers, c'est-à-dire en tampon enrichi de NaCl à la molarité de 0,5, l'albumine bovine n'est pas retenue par la colonne.

D'autres essais, au cours desquels la colonne fut équilibrée en Tris-HCl 0,025 M ou 0,005 M, ajusté à un pH compris entre 7 et 8, ont montré que dans ces conditions l'HPSM se lie au Cibacron (Blue).

Retenue pour la purification de l'HPSM, cette méthode a été réalisée de la manière suivante:

- les fractions riches en activité provenant de la chromatographie précédente, sont mélangées puis concentrées par ultrafiltration jusqu'à un volume de 250 ml (5 mg de protéines par ml);
- ensuite, la solution est traitée par filtration sur gel - réalisée dans une colonne (8 x 20 cm) de Sephadex G-25 Fine - pour amener les protéines en tampon Tris-HCl 0,02 M; $MgCl_2$ 0,005 M; pH 7,5;
- une colonne (6 x 20 cm) de Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia), préalablement équilibrée dans le même tampon, est chargée de la solution contenant les protéines puis lavée avec le tampon jusqu'à ce que la densité optique (235 nm) soit inférieure à 0,05;
- un gradient linéaire de force ionique (2 x 2 litres) est établi : le tampon A est le tampon de départ, tandis que le tampon B est constitué de Tris-HCl 0,02 M; $MgCl_2$ 0,005 M; pH 7,5 ; KCl 0,3 M.

2.2.3.4. PRODUCTION D'UNE COLONNE D'AFFINITE SPECIFIQUE DE L'ALBUMINE SERIQUE BOVINE.

Production d'un antisérum antialbumine sérique bovine

Trois lapins , âgés de 5 à 6 mois, sont immunisés, suivant la technique de Vaitukaitis et coll.(1971), au moyen de 500 µg de BSA (Boehringer, n° 238040) diluée dans 500 µl d'adjuvant complet de Freund (Difco). Les injections sont répétées 3 fois, à 2 semaines d'intervalle.

Trois mois après la première immunisation, les lapins sont sacrifiés et le maximum de sang est récolté.

Le sérum obtenu (50 à 70 ml) est testé selon la technique d'Ouchterlony (1948,1949), modifiée par Hartmann et Toilliez (1957). Du fait de leur équivalence, les antisérums ont été mélangés.

Purification des immunoglobulines

Les immunoglobulines sont précipitées par le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation (Kekwick, 1940), puis purifiées par chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia), équilibrée en acétate de sodium 0,05 M; pH 5, selon la technique de Harboe et Ingild (1973).

Activation du Sepharose 4B

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

- 50 g de CNBr sont solubilisés dans 2 litres d'eau désionisée, sous agitation constante pendant 20 à 30 minutes;
- 175 ml (environ 50 g) de Sepharose 4B (Pharmacia) sont ajoutés en une fois;
- le pH est amené entre 10 et 11 et maintenu dans cette zone, par addition continue d'une solution 0,2 M de NaOH (environ 500 ml), pendant une période de 5 à 6 minutes;
- le Sepharose 4B est versé sur un filtre en verre fritté, et lavé successivement au moyen d'eau désionisée froide (5 litres), d'acétone 50 % (5 litres) et d'un tampon NaHCO_3 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8 (10 litres).

Couplage des immunoglobulines au Sepharose activé

Les opérations se déroulent comme suit :

- les protéines à coupler, diluées dans le tampon NaHCO_3 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8, sont mises en présence du Sepharose 4B activé au CNBr, dans les proportions de 15 mg d'immunoglobulines pour 5 ml de gel;
- la solution est maintenue sous agitation par rotation lente (25 tours par minute) pendant 24 à 36 heures à 4°C;
- le Sepharose 4B activé, couplé aux immunoglobulines anti-albumine sérique bovine, est alors lavé sur un filtre en verre fritté, afin d'éliminer les protéines non couplées

au Sepharose (= 15 % en moyenne);

- les sites activés résiduels non occupés par les protéines, sont saturés par une solution 0,1 M d'éthanolamine; pH 8, pendant 1 à 2 heures;
- le gel est lavé successivement par du tampon NaHCO_3 0,1 M; pH 8 puis par du tampon acétate de sodium 0,1 M; pH 4 pendant 1 à 2 heures et enfin repris en tampon Tris-HCl 0,02 M; MgCl_2 0,005 M; pH 7,5; NaN_3 0,02 % et stocké à 4°C.

Détermination de la capacité de liaison du Sepharose 4B spécifique de l'albumine bovine.

Pour calculer la capacité de liaison du Sepharose 4B spécifique de l'albumine bovine, une colonne de 1,5 x 12,5 cm, équilibrée en Tris-HCl 0,02 M; MgCl_2 0,005 M; pH 7,5, est chargée d'une solution de BSA à la concentration de 100 µg/ml.

Le Sepharose 4B spécifique de l'albumine est capable d'épuiser 140 ml de la solution, correspondant au total à 14 mg d'albumine ; la capacité de liaison du Sepharose 4B spécifique de l'albumine est donc de \approx 0,6 mg de BSA par ml de gel (Fig.5).

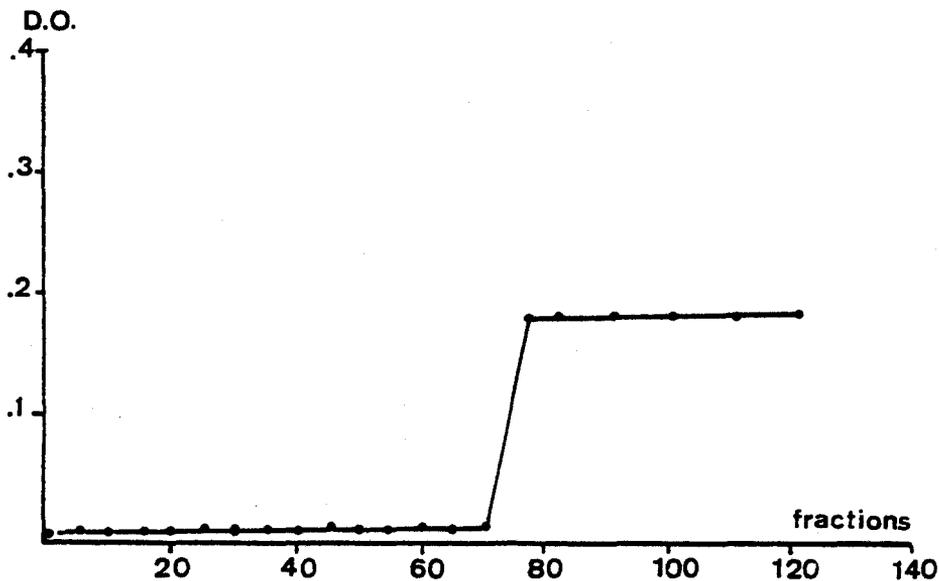
2.2.3.5. PRODUCTION D'UNE COLONNE D'AFFINITE SPECIFIQUE DE L'HEMOGLOBINE BOVINE.

Purification de l'hémoglobine foetale et maternelle

Peu de temps après l'abattage, d'une vache gestante, le sang de la mère et du foetus sont recueillis séparément dans des tubes héparinés. Après centrifugation à 3.000 g pendant 20 minutes, le plasma est écarté soigneusement.

Les érythrocytes sont lavés 2 fois, par une solution de NaCl 9 ‰, puis repris dans un volume égal d'eau distillée, pour provoquer l'hémolyse. La solution est agitée pendant

Fig.5 - DÉTERMINATION DE LA CAPACITÉ DU SEPHAROSE 4B SPÉCIFIQUE DE L'ALBUMINE SÉRIQUE BOVINE.



La colonne (1,5 x 12,5 cm), de Sepharose 4B spécifique de l'albumine , équilibrée en tampon Tris-HCl 0,02 M; MgCl₂ 0,005 M; pH 7,5, est chargée par une solution de bSA, à la concentration de 100 µg par ml diluée dans le même tampon. L'élution est réalisée selon un débit de 8 ml/heure.

En abscisse: numéro des fractions de 2 ml
En ordonnée: • = densité optique (235 nm).

quelques minutes, en présence de tétrachlorure de carbone, dans le rapport d'un volume de CCl_4 pour 5 volumes d'hémolysat.

Les différentes phases sont séparées par centrifugation; le tétrachlorure ainsi que la phase intermédiaire sont écartés (Koepke et coll., 1975).

Dosage de l'hémoglobine

Le dosage de l'hémoglobine est réalisé suivant la méthode de Drabkin (1946). L'absorbance de la solution est déterminée après transformation de l'hémoglobine en cyanométhémoglobine.

Production d'antisérums spécifiques de l'hémoglobine

Au total, 6 lapins ont été immunisés au moyen de l'hémoglobine foetale tandis que 3 l'étaient au moyen de l'hémoglobine adulte.

Tous les antisérums obtenus se sont révélés utilisables.

Purification des immunoglobulines et couplage au Sepharose 4B

Les antisérums ainsi obtenus sont traités en vue d'isoler les immunoglobulines (IgG) et de les coupler au Sepharose activé, de la même manière que les antisérums antjalbumine.

Détermination de la capacité de liaison du Sepharose 4B spécifique de l'hémoglobine.

La capacité de fixation du Sepharose 4B spécifique de l'hémoglobine bovine est déterminée comme pour l'albumine bovine. Une colonne (1,5 x 10 cm) de Sepharose 4B spécifique de l'hémoglobine foetale bovine, équilibrée en Tris-HCl 0,02 M; MgCl_2 0,005 M; pH 7,5 est chargée au

moyen d'une solution d'hémoglobine foetale à la concentration de 100 µg par ml. La densité optique est déterminée à 542 nm. Le Sepharose 4B spécifique de l'hémoglobine, fixe \approx 1,1 mg d'antigène par ml de gel.

2.2.3.6. CONDITIONS D'UTILISATION D'UNE COLONNE D'AFFINITE SPECIFIQUE DE L'ALBUMINE ET DE L'HEMOGLOBINE DANS LE SCHEMA DE PURIFICATION.

Les réactifs ainsi préparés nous ont permis de réaliser l'épuisement de la préparation d'HPSM de la manière suivante:

- la colonne contenant le Sepharose 4B, spécifique de l'albumine et de l'hémoglobine (1 x 10 cm), est équilibrée en tampon Tris-HCl 0,02 M; MgCl₂ 0,005 M; pH 7,5; elle est lavée abondamment pour éliminer complètement toutes les protéines, qui ne sont pas liées par liaison covalente ou qui sont partiellement dénaturées;
- préalablement au chargement, les fractions riches en activité hormonale, provenant de la colonne Blue Sepharose CL-6B sont mélangées puis concentrées par ultrafiltration (cellule Millipore 70 mm de diamètre, membrane PM 10.000, pression 4 bars), jusqu'à un volume de 30 ml (2 à 3 mg de protéines par ml);
- la solution est ensuite traitée par filtration sur gel de Sephadex G-25 (colonne 2,5 x 25 cm) pour amener les protéines en tampon Tris-HCl 0,02 M; MgCl₂ 0,005 M; pH 7,5;
- la solution contenant l'HPSM est chargée sur la colonne spécifique de l'albumine et de l'hémoglobine en adoptant un débit de 2 ml par heure;
- au fur et à mesure de son élution, la solution, débarrassée de l'albumine et de l'hémoglobine qu'elle contenait, est chargée sur la colonne suivante.

2.2.3.7. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR MÄTREX GEL RED A

La colonne (1,5 x 10 cm) de Mätrex Gel Red A (Amicon), préalablement équilibrée en Tris-HCl 0,02 M; MgCl₂ 0,005 M; pH 7,5, est chargée par raccordement direct à la colonne d'affinité.

Après le chargement, le gel est lavé par le tampon de départ, puis les protéines sont éluées par un gradient de force ionique.

La densité optique et l'activité hormonale sont déterminées dans les différentes fractions.

2.2.3.8. DIALYSE ET LYOPHILISATION

La solution contenant l'hormone est dialysée contre un tampon NH₄HCO₃ 0,005 M; ajusté à pH 8,5 au moyen de NH₄OH. La solution est congelée à -50°C et lyophilisée.

2.3. RESULTATS

L'activité hormonale de l'HPSM a été repérée - dans les différents extraits, et dans les différentes fractions obtenues en cours de purification - au moyen des dosages de la prolactine et de l'hormone de croissance, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Il faut cependant signaler que les premiers dosages ont révélé l'absence de parallélisme entre les courbes de dilutions des extraits d'HPSM et celles des standards de référence: prolactine et hormone de croissance.

Nous avons tenu compte de cette absence de parallélisme des courbes de dilutions, en calculant les concentrations

en HPSM à partir des valeurs obtenues pour une inhibition d'environ 50 % de la liaison.

En raison de cette absence de parallélisme — entre les pentes des courbes d'inhibition par les hormones de référence et les préparations contenant l'HPSM — les concentrations en HPSM sont donc exprimées dans les limites de validité de ces dosages; nous exprimons cette limitation par les expressions éq.PRL ou éq.GH.

2.3.1. EXTRACTION DE L'HORMONE

2.3.1.1. PARTIE DU PLACENTA LA PLUS RICHE EN HORMONE

Des différentes parties constitutives du placenta, les cotylédons foetaux sont les plus riches en hormone (tableau 3); ils ont, de ce fait, été choisis comme matériel de départ pour la purification.

2.3.1.2. EPOQUE DE LA GESTATION LA PLUS FAVORABLE POUR LE PRELEVEMENT.

La teneur des cotylédons foetaux en hormone est assez constante au cours de la gestation (tableau 4).

Toutefois, l'extrait de placentas jeunes est en général très visqueux tandis que celui de placentas âgés contient beaucoup de sang, du fait de la vascularisation importante de ces derniers. Ces éléments, viscosité et présence de sang, sont défavorables aux opérations ultérieures de purification; en conséquence, nous n'avons récolté que des placentas d'âge moyen.

2.3.1.3. PROCEDE OPTIMAL D'EXTRACTION

Les différentes extractions réalisées dans des conditions déterminées, ont permis de préciser le

Tableau 3 - ACTIVITÉ HORMONALE DANS LES DIFFÉRENTES PARTIES
DU PLACENTA.

Tissus*	Activité hormonale		
	éq.PRL mg/kg	éq.GH mg/kg	Protéines** mg/kg
Cotyl. foet.	26	76	40.600
Cotyl. mat.	7	20	55.340

	éq.PRL mg/litre	éq.GH mg/litre	Protéines** mg/litre
Liq. amniot.	< 0,02***	< 0,03***	260
Liq. allant.	< 0,11***	< 0,19***	2.920
Plasma foet.	< 0,07***	< 0,20***	-

* L'expérience a porté sur 13 placentas d'âges différents (2,5 à 3 mois).

** Le dosage des protéines a été réalisé suivant la méthode de Lowry et coll.(1951) en utilisant la BSA comme standard.

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

Tableau 4 - RICHESSE DES COTYLÉDONS FOETAUX EN HORMONE,
SUIVANT LE MOMENT DE LA GESTATION.

Age du foetus en mois	Activité hormonale		Protéines* mg/kg
	éq.PRL mg/kg	éq.GH mg/kg	
2 à 3	23	75	39.400
2 à 3	17	75	28.000
2 à 3	14	-	22.700
3	18	57	34.900
3	15	-	29.600
3	23	120	41.000
3 à 4	23	90	40.200
4 à 5	25	52	30.400
5	40	-	45.500
7 (jumeaux)	28	57	47.800
8	34	85	87.200

* Le dosage des protéines a été réalisé suivant la méthode de Lowry et coll. (1951) en utilisant la bSA comme standard.

procédé d'extraction le plus efficace (tableau 5).

Réalisée en tampon NH_4HCO_3 0,1 M ajusté à pH 9,5 avec du NH_4OH et en respectant un rapport poids de tissu /volume de tampon de 1/5, l'extraction permet de récupérer en moyenne par kg de cotylédons frais une activité hormonale équivalente à 28,5 mg de prolactine (bPRL-NIH-B4) ou 85 mg d'hormone de croissance (bGH-NIH-B18). Dans ces conditions, 42,5 g de protéines totales (Lowry) sont également extraites par kg de cotylédons foetaux.

2.3.2. PRÉCIPITATION DES PROTÉINES AU SULFATE D'AMMONIUM

La précipitation des protéines au sulfate d'ammonium s'accompagne d'un facteur d'enrichissement de l'activité hormonale de 2,4. Une grande quantité de protéines contaminantes est écartée, cependant, environ 50 % de l'activité hormonale est également perdue au cours de cette étape.

2.3.3. PURIFICATION DE L'HPSM PAR CHROMATOGRAPHIE.

Après la précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, nous avons décidé de poursuivre la purification de l'HPSM par chromatographie plutôt que par précipitation au moyen de solvants tels que l'acétone, l'éthanol, le rivanol ou le butanol.

2.3.3.1. CHROMATOGRAPHIE SUR RESINE ECHANGEUSE D'ANIONS, DEAE-SEPHADEX A-25.

La purification de la préparation par chromatographie sur résine échangeuse d'anions constitue la première étape chromatographique de notre schéma définitif.

Les dosages des protéines et de l'activité hormonale

Tableau 5 - DÉTERMINATION D'UN PROCÉDÉ D'EXTRACTION EFFICACE: ACTIVITÉ HORMONALE
EXTRAITE DE COTYLÉDONS FOETAUX EN FONCTION DU PROCÉDÉ UTILISÉ.

Procédé n°	Tampon A		Tampon B		Quantité d'hormone extraite par kg de cotylédons					
	nature	pH	nature	pH	1 ^{er} extrait		2 ^e extrait		Total	
					1 ^{er} ext. + 2 ^e ext.	1 ^{er} ext.	2 ^e ext.	1 ^{er} ext.	2 ^e ext.	
					éq.GH	éq.PRL	éq.GH	éq.PRL	éq.GH	éq.PRL
				mg	mg	mg	mg	mg	mg	
1	CH ₃ COONH ₄	5,0	-	-	4	1	-	-	4	1
2	CH ₃ COONH ₄	5,0	NH ₄ HCO ₃	9,5	3	2	19	6	22	8
3	CH ₃ COONH ₄	6,0	NH ₄ HCO ₃	9,5	46	18	53	20	99	38
4	CH ₃ COONH ₄	6,0	NH ₄ HCO ₃	10,5	45	18	55	18	100	36
5	CH ₃ COONH ₄	6,5	NH ₄ HCO ₃	9,5	56	21	52	14	108	35
6	NH ₄ HCO ₃	9,5	-	-	78	29	-	-	78	29
7	NH ₄ HCO ₃	9,5	NH ₄ HCO ₃	9,5	82	25	31	13	113	38

permettent de repérer la fraction la plus riche en hormone (fraction III) dans laquelle l'HPSM se trouve purifiée 3,5 fois. Le rendement de récupération de l'activité hormonale au cours de cette étape est de $\approx 57\%$.

2.3.3.2. CHROMATOGRAPHIE D'HYDROPHOBICITE SUR PHENYL-SEPHAROSE CL-4B

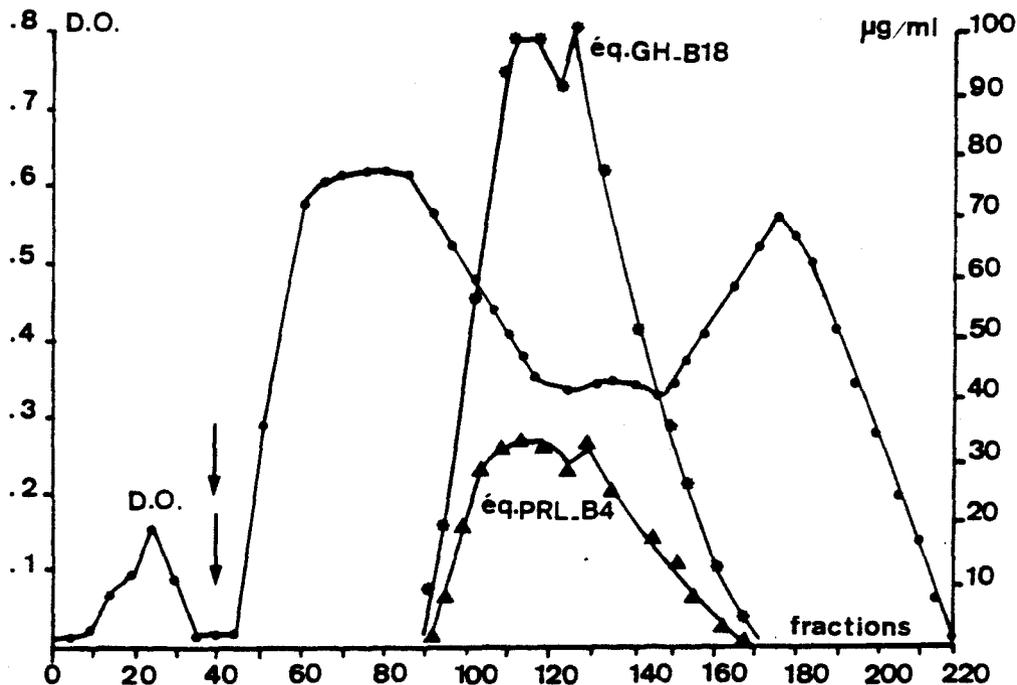
Après la chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25, les protéines se trouvent dans un tampon dont la force ionique et le pH sont relativement élevés. Ces conditions paraissent favorables à la conservation de l'activité hormonale de l'HPSM, il nous a donc paru logique d'appliquer à ce stade une chromatographie d'hydrophobicité.

Les résultats de cette chromatographie apparaissent dans la Fig.6. L'hormone se trouve - concentrée - dans les fractions médianes du gradient de force ionique, elle est enrichie 4,4 fois. Le rendement de récupération de l'activité hormonale est de $\approx 61\%$.

2.3.3.3. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR BLUE SEPHAROSE CL-6B

A ce stade de la purification, la préparation possède un niveau d'activité relativement faible et présente une image hétérogène en électrophorèse sur gel de polyacrylamide révélant notamment la présence d'hémoglobine et d'albumine. Développée dans le but initial d'éliminer l'albumine bovine, de la même manière que l'albumine humaine, la chromatographie sur Blue Sepharose CL-6B a été modifiée et s'est révélée très efficace pour enrichir la préparation en activité hormonale. L'élution des protéines par un gradient de force ionique permet de concentrer l'HPSM dans quelques fractions. L'activité hormonale s'en trouve enrichie de 11,6 fois ; le rendement de récupération de l'activité, au cours de cette chromatographie, est de $\approx 55\%$ (Fig.7).

Fig.6 - CHROMATOGRAPHIE SUR PHENYL-SEPHAROSE CL-4B



La colonne (5 x 15 cm) est équilibrée en NH_4HCO_3 0,1 M; NaCl 0,1 M; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M; pH 9,5. Après chargement d'environ 5 g de protéines, la colonne est lavée par 500 ml de tampon d'équilibration puis les protéines sont éluées par un gradient linéaire de 2 fois 2 litres: le tampon A est le tampon d'équilibration et le tampon B est du tampon NH_4HCO_3 0,1 M; NaCl 0,1 M; pH 9,5 dilué à 50 % dans de l'éthylène-glycol.

Le débit est de 120 ml/heure, la température de 4°C.

En abscisse: numéro des fractions de 25 ml.

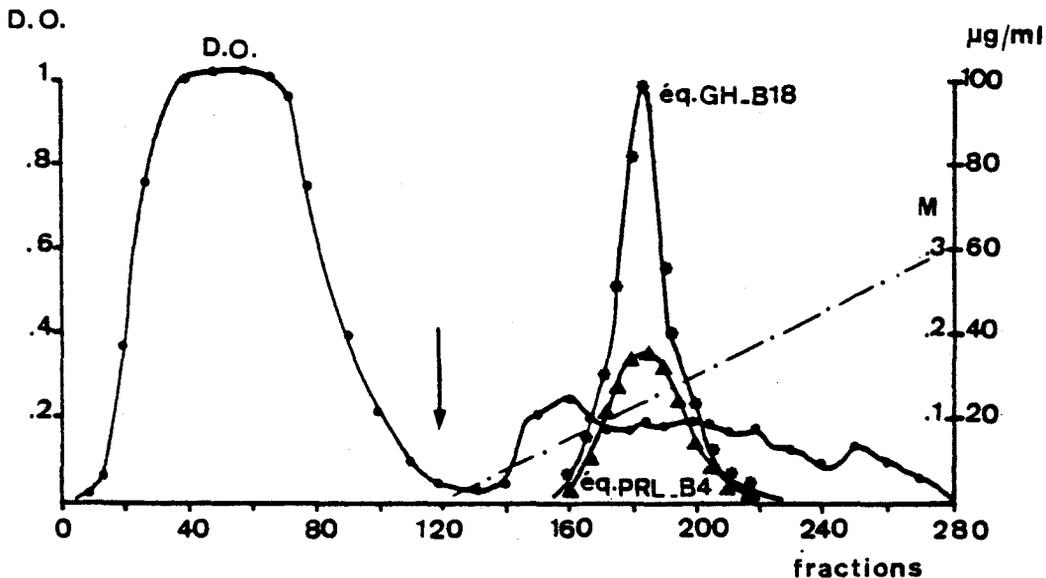
En ordonnée: à gauche ● = densité optique (280 nm)

à droite ▲ = activité prolactinique (µg/ml)

à droite ◐ = activité somatotrope (µg/ml)

↓ = début du gradient

Fig.7 - CHROMATOGRAPHIE SUR BLUE SEPHAROSE CL-6B



La colonne (6 x 20 cm) est équilibrée en Tris-HCl 0,02 M; $MgCl_2$ 0,005 M; pH 7,5. Après le chargement d'environ 800 mg de protéines, la colonne est lavée par le tampon d'équilibration puis éluée par un gradient linéaire de 2 fois 2 litres, le tampon A est le tampon d'équilibration, le tampon B est le tampon A additionné de KCl 0,3 M.

Le débit est de 180 ml/heure et la température de 4°C.

En abscisse: numéro des fractions de 25 ml.

En ordonnée: à gauche • = densité optique (235 nm)

à droite * = activité somatotrophe (µg/ml)

à droite ▲ = activité prolactinique (µg/ml)

--- = molarité de KCl (M)

↓ = début du gradient.

2.3.3.4. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR SEPHAROSE 4B SPECIFIQUE DE L'ALBUMINE SERIQUE ET DE L'HEMOGLOBINE FOETALE BOVINES

Suite aux traitements antérieurs, la préparation présente à ce stade, une activité hormonale élevée mais l'électrophorèse en gel de polyacrylamide révèle une faible bande supplémentaire qui correspond à l'albumine sérique (bSA) (Fig.8).

En immunodiffusion sur gel d'Agar, la même préparation présente une zone de précipitation avec un antisérum anti-albumine, à partir d'une concentration supérieure à 50 µg.

Cette contamination par la bSA s'explique, partiellement du moins, par l'élution presque simultanée de celle-ci et de l'HPSM sur Blue Sepharose CL-6B.

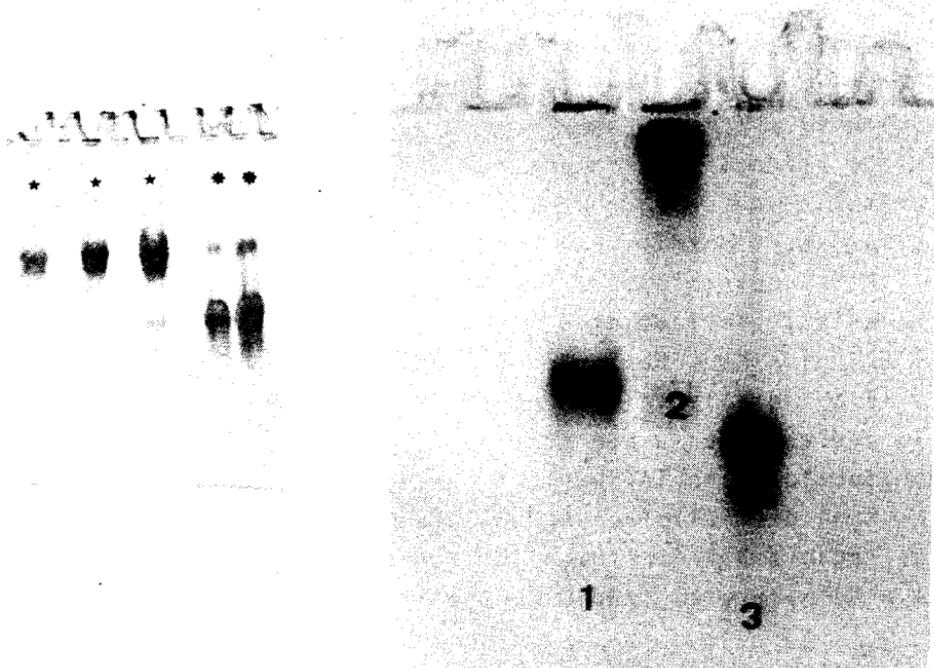
Bien qu'elle soit en quantité relativement faible (< 5 %) la présence de la bSA peut néanmoins être gênante dans la production d'antisérums.

Afin de l'éliminer complètement et rapidement, nous avons eu recours à l'épuisement par chromatographie d'affinité sur Sepharose 4B spécifique de l'albumine sérique bovine.

Après chromatographie sur Blue Sepharose CL-6B, la préparation d'HPSM présente le plus souvent une couleur rosée laissant suspecter la présence d'hémoglobine. Cette contamination comme la bSA est difficilement éliminée car, sur résine échangeuse d'anions notamment, le comportement de ces protéines ne diffère pas grandement de celui de l'HPSM. Les points (ou pH) isoélectriques sont en effet assez proches : hémoglobine foetale ≈ 6,8 ; bSA ≈ 4,7 et HPSM ≈ 5,2. Ces observations nous ont amenés à mettre au point un système de chromatographie d'affinité basé sur l'utilisation de Sepharose 4B spécifique de l'hémoglobine foetale et adulte bovine.

La chromatographie de l'extrait contenant l'hormone,

Fig. 8 - ÉLECTROPHORÈSE DE DEUX PRÉPARATIONS D'HPSM, EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.



L'électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide (acrylamide 7,5 % + 2,5 % de bisacrylamide dans l'acrylamide) en tampon glycine 0,5 M ajusté à pH 8,3 avec du Tris. La migration se poursuit durant 5 heures ,dans un champ de 10 V/cm à la température de 4°C (confer 3.2.1. ,page 85).

* = préparation d'HPSM n° 322;20,40,80 µg ,légèrement contaminée par l'albumine

* = albumine sérique bovine

1 = HPSM purifiée

2 = hormone de croissance (bGH-NIH-818)

3 = prolactine(bPRL-NIH-84)

sur une colonne d'affinité spécifique de l'albumine et de l'hémoglobine, a été réalisée dans les conditions décrites antérieurement. Au fur et à mesure de son élution, la solution débarrassée de l'albumine et de l'hémoglobine qu'elle contenait est chargée sur la colonne suivante. (Mätrex Gel Red A). Cette manière de procéder permet une élution selon un débit relativement faible sans allongement trop important de la durée des opérations. Etant donné que cette chromatographie était réalisée en connexion avec la suivante, nous n'avons pas établi son rendement.

2.3.3.5. CHROMATOGRAPHIE SUR MÄTREX GEL RED A

Réalisée en dernier lieu, cette chromatographie permet d'enrichir la préparation hormonale 3,5 fois (Fig.9); son rendement est de 52 %. La préparation hormonale présente un niveau d'activité très élevé et s'avère homogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide (Fig.8).

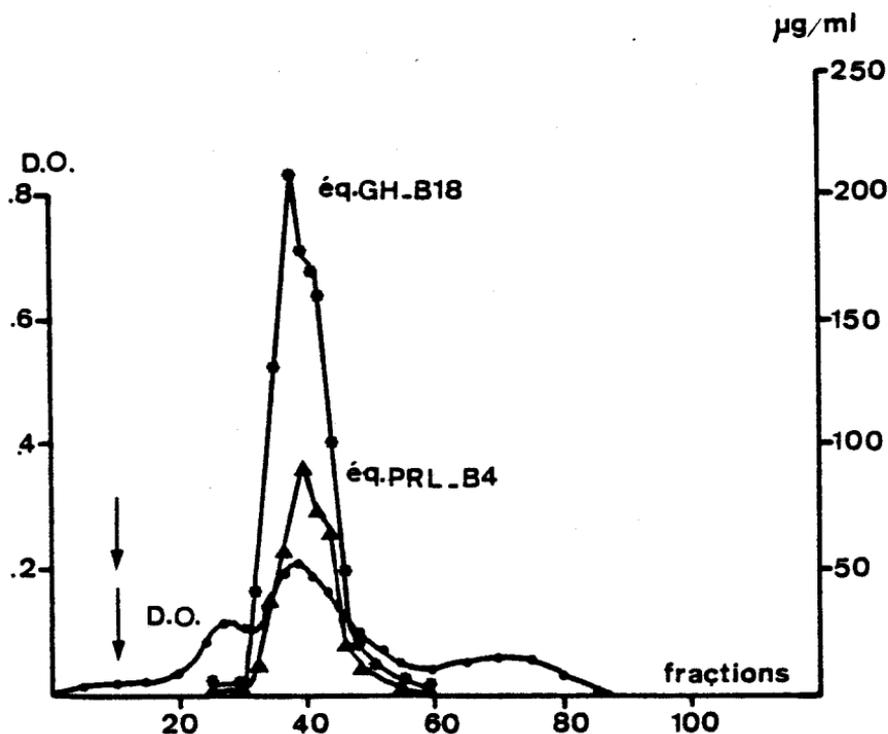
2.3.3.6. DIALYSE ET LYOPHILISATION

Les fractions les plus actives sont mélangées puis dialysées contre un tampon NH_4HCO_3 0,005 M; ajusté à pH 8,5 au moyen de NH_4OH . Enfin, la solution contenant l'hormone est lyophilisée.

2.3.4. SCHÉMA DE PURIFICATION DE L'HPSM

La séquence de ces différentes étapes a été étudiée de manière à limiter au maximum le nombre de dialyses. L'extraction de l'hormone par un tampon à pH 9,5 est suivie d'une précipitation au sulfate d'ammonium et d'une série de cinq chromatographies réalisées sur : DEAE-Sephadex A-25, Phenyl-Sepharose CL-4B, Blue Sepharose CL-6B, Sepharose 4B spécifique de l'albumine et de l'hémoglobine et enfin

Fig.9 - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR MATREX GEL RED A.



La colonne (1,5 x 10 cm) est équilibrée en Tris-HCl 0,02 M; $MgCl_2$ 0,005 M; pH 7,5. Après chargement de 40 mg de protéines, la colonne est lavée par le tampon d'équilibration puis, les protéines sont éluées par un gradient linéaire de 2 fois 500 ml; le tampon A est le tampon d'équilibration, le tampon B est du tampon A , additionné de KCl 0,3 M.

Le débit est de 80 ml/heure et la température de 4°C.

En abscisse: numéro des fractions de 12 ml

En ordonnée: à gauche ● = densité optique (235 nm)
à droite ▲ = activité prolactinique (µg/ml)
à droite ■ = activité somatotrope (µg/ml)
↓ = début du gradient

Mâtrex Gel Red A .

Le facteur d'enrichissement est calculé en rapportant l'activité spécifique (activité hormonale/protéines) de chaque étape de la purification à celle de l'extrait initial (tableau 6).

L'application minutieuse de ce schéma de purification permet d'enrichir ≈ 1.500 fois la préparation en HPSM.

Dans le dosage de la prolactine, la quantité d'HPSM nécessaire pour produire une inhibition de 50 % de la liaison correspond à 0,8 fois celle de prolactine NIH-B4 - capable d'entraîner cette même inhibition de 50 % - (Fig.10).

Dans le dosage de l'hormone de croissance, la quantité d'HPSM capable de produire une inhibition de 50 % de la liaison équivaut à 0,3 fois celle de l'hormone de croissance NIH-B18 - nécessaire à produire cette même inhibition- (Fig.11).

L'absence de parallélisme entre les courbes d'inhibition - produites par les diverses préparations d'HPSM et celles produites par les hormones hypophysaires de référence - situe l'HPSM comme *agoniste partiel* de ces hormones dans les dosages. Dans ces conditions, il paraît plus logique de comparer l'HPSM aux hormones hypophysaires, non plus en termes d'inhibition de 50 % mais plutôt en fonction de la quantité minimale d'hormone capable d'inhiber la liaison de l'hormone radioactive.

Dans le dosage de la prolactine, la plus petite quantité d'HPSM produisant une inhibition significative de la liaison de l'hormone radioactive est de 0,13 ng; par comparaison ,celle de prolactine (PRL-NIH-B4) est de 0,75 ng.

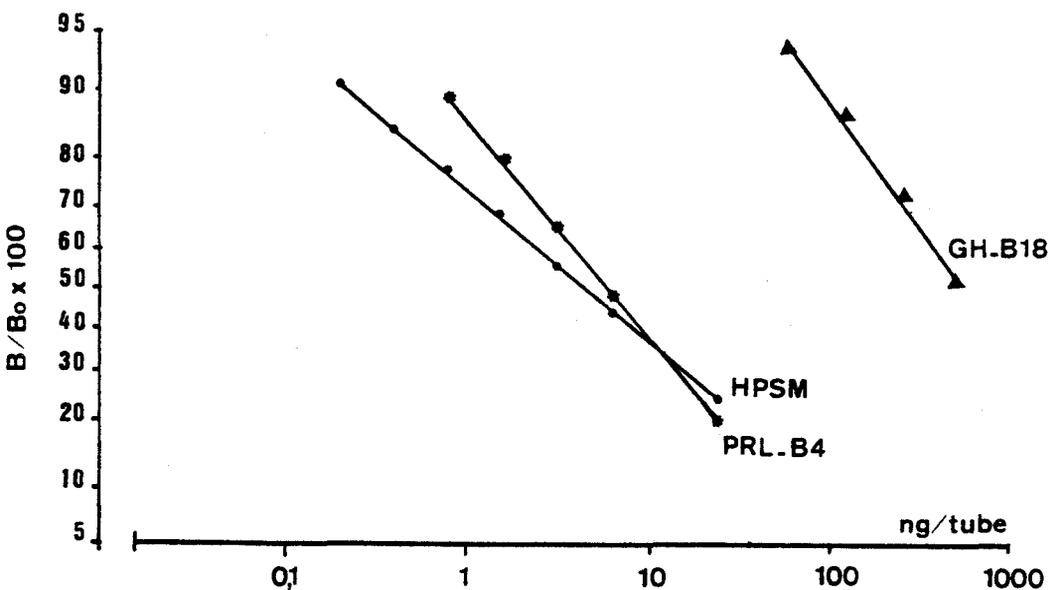
Dans le dosage de l'hormone de croissance, la plus petite quantité d'HPSM produisant une inhibition significative de la liaison de l'hormone radioactive est de 0,08 ng; par comparaison, celle de l'hormone de croissance (GH-NIH-B18) est de 0,18 ng.

Tableau 6 - ACTIVITÉ HORMONALE DE LA PRÉPARATION AU COURS DES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE L'ISOLEMENT*, RENDEMENT DE LA PURIFICATION ET FACTEUR D'ENRICHISSEMENT DE L'HORMONE.

Étapes de l'isolement	Protéines (mg)	Activité hormonale		Récupération de l'activité hormonale en %	Facteur d'enrichissement
		éq. PRL	éq. GH		
Extrait d'un kg de cotyl. foetaux	42.500	28,5	85,6	100	1
Précipité 65 % (NH ₄) ₂ SO ₄	8.500	14,9	40,2	48	2
DEAE-Sephadex A-25 Fraction III, (0,1 M)	1.390	8,3	23,4	28	8
Phenyl-Sepharose CL-4B	193	4,3	14,9	17	37
Blue Sepharose CL-6B	9	2,8	7,8	9	433
Sepharose 4B spécifique de l'albumine et de l'hémoglobine	-	-	-	-	-
Mātrex Gel Red A	1	1,3	4,4	5	1.510

* Ces résultats correspondent à la moyenne de 3 purifications.

Fig. 10- ETUDE DU COMPORTEMENT DE L'HPSM DANS LE DOSAGE DE LA PROLACTINE PAR LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE.



Caractéristiques: T \approx 15.000 cpm PRL 125 I; NSB = 440 cpm \approx 3 %;
Bo/T \approx 22 %; Bmax/T \approx 46 %.

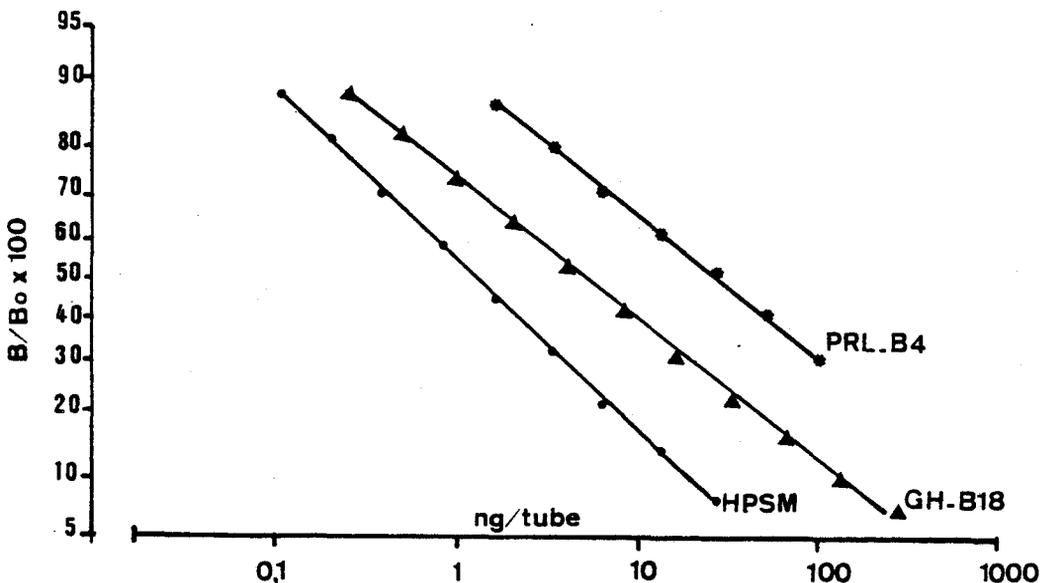
En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu(ng/tube).

En ordonnée: (échelle logit) B/Bo x 100.

Hormone	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 % de la liaison (ng/tube)	Dose minimale produisant une inhibition (ng/tube)
Prolactine	- 1,02	6,07 \pm 0,25	0,75
Hormone de croissance	- 1,29	554,20 \pm 22,50	75,13
HPSM purifiée	- 0,72*	4,75 \pm 0,14	0,13

* Pente significativement différente (P < 0,05) de celle obtenue pour la courbe d'inhibition par la prolactine bPRL-NIH-B4.

Fig.11 - ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE L'HPSM DANS LE DOSAGE DE L'HORMONE DE CROISSANCE PAR LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES HÉPATIQUES DE LAPINE GESTANTE.



Caractéristiques: T = 15.000 cpm GH ¹²⁵I; NSB = 500 cpm = 3,3 %;
Bo/T = 19 %; Bmax/T = 39 %.

En abscisse: (échelle logarithmique). Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle logit) B/Bo x 100.

Hormone	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 % de la liaison (ng/tube)	Dose minimale produisant une inhibition (ng/tube)
Hormone de croissance	- 0,66	4,99 ± 0,18	0,18
Prolactine	- 0,64	29,98 ± 1,09	0,84
HPSM purifiée	- 0,81*	1,33 ± 0,04	0,08

* Pente significativement différente (P < 0,05) de celle obtenue pour la courbe d'inhibition par l'hormone de croissance bGH-NIH-B18

2.4. DISCUSSION

L'optimisation d'un schéma de purification de l'HPSM n'a été possible que suite à une longue série d'essais au cours desquels de nombreuses techniques ont été éprouvées. La plupart se sont révélées inopérantes ou mal adaptées à notre préparation, elles ont, de ce fait, été abandonnées.

Parmi ces méthodes, nous signalerons en particulier:

- la filtration sur gel, qui s'est révélée efficace mais qui reste mal adaptée au traitement de grandes quantités de protéines;
- la chromatographie sur résines échangeuses de cations (CM ou SP-Sephadex) qui nous a fourni des résultats médiocres suite à l'insolubilisation d'une fraction importante des protéines, lorsque le pH de la solution est inférieur à 6;
- la chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite qui ne permet aucun enrichissement de l'hormone;
- la chromatographie d'affinité sur Con A-Sepharose qui s'est révélée inutile.

Ces premiers essais ont attiré notre attention sur la dégradation rapide de l'HPSM en solution. Dès lors, l'efficacité d'une méthode de purification apparaît comme liée, du moins partiellement, à sa rapidité.

L'application du schéma de purification comprend différentes étapes qui doivent être réalisées dans un ordre déterminé. La séquence comprend les étapes suivantes: extraction de l'hormone à partir des cotylédons foetaux, précipitation des protéines au sulfate d'ammonium et enfin cinq étapes chromatographiques. Ces dernières sont basées sur différentes propriétés des protéines: charge électrique, hydrophobicité, affinité spécifique des immunoglobulines — immobilisées — pour leur antigène homologue et affinité des protéines

pour les colorants de type *Cybacron* (Blue Sepharose CL-6B) ou *Procton* (Mätrex Gel Red A.)

Au cours de ces opérations, l'hormone est purifiée environ 1.500 fois. Ce facteur de purification est nettement plus élevé que celui décrit par Bolander et Fellows (1976) qui ont enrichi leur préparation initiale 41 fois, et que celui de Hayden et Forsyth (1979) qui ont purifié l'HPSM 300 à 500 fois.

Les deux activités principales, prolactinique et somatotrope de l'HPSM sont dosées, au cours de chacune des différentes étapes de son enrichissement et, aucune discordance n'est observée dans les résultats de ces dosages. En effet, en dehors de l'erreur de quantification due à l'absence de parallélisme des courbes de dilution, l'enrichissement suit la même progression dans les deux systèmes de dosage. Cette observation suggère fortement que c'est bien la même protéine qui possède simultanément ces deux activités.

Dans le dosage de la prolactine et dans celui de l'hormone de croissance, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires, les pentes des courbes d'inhibition par l'HPSM, ne sont pas parallèles à celles des standards, utilisés dans ces dosages, de sorte qu'aucune comparaison quantitative d'activité, ne peut être établie (Fig.10 et 11); l'HPSM doit être considérée comme *agoniste partiel* de la prolactine et de l'hormone de croissance. Dans la limite de validité des comparaisons qui peuvent être faites, l'HPSM possède, à la fois, une activité prolactinique et une activité somatotrope élevées. Cette caractéristique l'apparente à l'oCS (oPL), qui présente également ces deux activités à un niveau élevé, mais la distingue considérablement de l'hPL qui ne possède qu'une faible activité somatotrope.

Bien que les correspondances soient difficiles à établir, à cause de la variété des standards de référence et des systèmes de dosage utilisés, nous pouvons tenter de comparer notre préparation à celles des autres auteurs ayant purifié l'HPSM.

Bolander et Fellows (1976) obtiennent une préparation dont l'activité est très faible. Dans leurs dosages par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires, 1 mg de cette hormone présente la même activité que 1,3 µg de prolactine (NIH-B3) et que 630 ng d'hormone de croissance (NIH-B17) bovines. Dans leurs expériences, les courbes d'inhibition de la liaison par le bPL apparaissent comme parallèles à celles des standards de référence.

Roy et coll. (1977) ont purifié une hormone présentant une activité somatotrope équivalente à 0,3 UI/mg et une activité prolactinique équivalente à 7 UI/mg, mesurées selon la méthode de dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Ce niveau d'activité n'est pas sensiblement différent de celui de notre préparation, bien qu'il soit inférieur surtout en ce qui concerne l'activité somatotrope.

Enfin, Hayden et Forsyth (1979) ont obtenu une préparation de bPL, douée d'une activité biologique équivalente à celle de la prolactine ovine (25 UI/mg protéine). Cette activité a été mesurée dans un test biologique *in vitro* basé sur la stimulation de l'activité sécrétoire de la glande mammaire de souris.

3. ETUDE DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HPSM,

3.1. INTRODUCTION

Nous disposons d'une préparation d'HPSM très active dans les dosages de la prolactine et de l'hormone somatotrope, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Il nous a paru intéressant d'étudier les caractères physico-chimiques de cette molécule hormonale placentaire, dans le but plus particulier de la comparer aux hormones hypophysaires, auxquelles elle est apparentée.

Nos recherches ont d'abord porté sur le contrôle de l'homogénéité de la préparation; ensuite elles ont eu pour objectif la détermination du poids moléculaire (PM) et du point isoélectrique (pH_i) de l'HPSM.

3.2. MATERIELS ET METHODES

3.2.1. ELECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Cette technique fut développée selon les méthodes d'Ornstein (1964) et de Davis (1964), modifiées de la manière suivante:

Préparation du gel

7,4 g d'acrylamide et 0,2 g de bisacrylamide sont dissous dans 95 ml de tampon glycine (0,5 M) ajusté à pH 8,3 au moyen de Tris puis additionnés successivement de 75 mg de persulfate d'ammonium dilués dans 5 ml de tampon Tris-glycine et de 150 μ l de Temed (N-N'-N'-N'-tétraméthylène-diamine). La solution est ensuite versée dans l'emplacement prévu à cet effet dans l'appareil d'électrophorèse. Un peigne est placé au-dessus du gel de manière à créer 20 godets de \approx 50 μ l. La polymérisation est complète après 10 à 15 minutes. Le gel est ensuite refroidi à 0°C, puis le peigne est retiré et les deux réservoirs d'électrodes sont remplis de tampon glycine 0,5 M ajusté à pH 8,3 au moyen de Tris. Les dimensions du gel sont les suivantes: largeur= 20 cm; hauteur =10 cm; épaisseur= 0,15 cm.

Préparation des échantillons

Les protéines sont diluées à la concentration de 2 mg/ml dans du tampon Tris-glycine 0,5 M; pH 8,3 ; 10 % de glycérol (V/V) et additionnées de quelques grains de bleu de bromophénol. Cinq à 25 μ l (10 à 50 μ g de protéines) sont déposés dans chaque godet.

Migration

L'électrophorèse est assurée grâce à un champ électrique de 3 V/cm durant 1/2 heure puis de 10V/cm pendant 4 à 5 heures, soit jusqu'au moment où le bleu de bromophénol a parcouru toute la hauteur du gel. La température est maintenue aux environs de 0°C au moyen du système réfrigérant avec circulation de liquide.

Fixation

Le gel est fixé pendant 16 heures à température ordinaire dans un mélange eau(7), méthanol (3) (V/V) additionné de 144 g/l d'acide trichloracétique et de 34 g/l d'acide sulfosalicylique.

Coloration

Le gel est ensuite coloré pendant 1 heure 1/2 à température ordinaire dans un mélange d'eau désionisée (4,5), méthanol (4,5), acide acétique (1) (V/V/V) contenant 2,5 g de bleu de Coomassie R 250 par litre (0,25 %).

Décoloration

Le gel est décoloré par passages successifs dans plusieurs bains d'un mélange d'eau désionisée (1), méthanol (0,3), acide acétique (0,1) (V/V/V). La décoloration est poursuivie jusqu'à clarification du fond du gel.

3.2.2. ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE RÉALISÉE EN PRÉSENCE DE SDS,

La technique fut développée selon les méthodes de Shapiro et coll. (1967); Weber et Osborn (1969); Pitt-Rivers et Impiombato (1968) et Nelson (1971) modifiées de la manière suivante:

Préparation du gel

7,4 g d'acrylamide et 0,2 g de bisacrylamide sont dissous dans 95 ml de tampon phosphate 0,1 M; pH 7,1 contenant 10 g/l de SDS. Ce mélange est additionné de 75 mg de persulfate d'ammonium dilués dans 5 ml de tampon

et de 150 μ l de Temed. La solution ainsi préparée est versée dans l'emplacement prévu à cet effet dans l'appareil d'électrophorèse. La polymérisation est complète après 10 à 15 minutes. Le gel est refroidi à 0°C, les réservoirs d'électrodes sont remplis de tampon phosphate de sodium 0,1 M; pH 7,1. Les dimensions du gel sont les suivantes: largeur= 20 cm; hauteur= 10 cm; épaisseur= 0,15 cm.

Préparation des échantillons

Les protéines sont solubilisées à la concentration de 1 à 2 mg/ml dans le tampon phosphate 0,1 M; pH 7,1 contenant 1 % en volume de 2-mercaptoéthanol et 1 % en poids de SDS. Les échantillons sont incubés pendant 16 heures à 30°C dans un bain-marie. Avant le chargement, chaque échantillon est additionné de glycérol et de quelques grains de bromophénol.

Migration

L'électrophorèse est assurée par un champ électrique de 3 V/cm durant 1 heure puis de 10 V/cm durant 5 à 6 heures, soit jusqu'au moment où le bleu de bromophénol a parcouru toute la hauteur du gel. La température est maintenue à 0°C pendant toute la migration.

Fixation, coloration et décoloration

Ces étapes sont réalisées de la même manière que précédemment.

3.2.3. FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

La focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide a été réalisée suivant les méthodes de Svensson (1961); Vesterberg et Svensson (1966); Leaback et Rutter (1968);

Dale et Latner (1968); Wrigley (1968). Elle a été développée de la manière suivante:

Préparation des tampons

Le tampon anodique est constitué d'acide glutamique 0,04 M; le tampon cathodique, d'histidine 0,2 M.

Préparation du gel

2,5 g d'acrylamide et 0,150 g de bisacrylamide sont solubilisés dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange est additionné successivement de 3 ml d'ampholytes (Pharmalytes) pH 4 - 6,5 ou pH 3 - 10, de 500 μ l d'une solution de persulfate d'ammonium à 75 mg/ml et de 75 μ l de Temed. Ainsi préparée, la solution est versée dans l'emplacement prévu à cet effet dans l'appareil d'électrophorèse. La polymérisation est complète après 10 à 15 minutes. Les dimensions du gel sont: hauteur = 10 cm; largeur = 5,5 cm; épaisseur = 0,15 cm; le godet créé au-dessus a 2 cm de large (contenance \approx 150 μ l). Le gel est refroidi à 0°C, les réservoirs d'électrodes sont remplis au moyen des tampons anodique et cathodique décrits ci-dessus.

Préparation des échantillons

50 μ g de protéines sont solubilisés dans une solution contenant 10 % de glycérol et quelques grains de bleu de bromophénol. Cette solution est ensuite déposée dans le godet du gel.

Migration

Une préélectrophorèse est réalisée pendant 1 heure, dans un champ de 8 V/cm; l'intensité du courant est de \approx 7 mA.

L'électrophorèse, proprement dite, est conduite pendant 16 à 17 heures dans un champ de ≈ 8 V/cm; l'intensité du courant diminue progressivement jusqu'à ≈ 1 mA. La température est maintenue à 0°C pendant toute la migration.

Coloration

Le gel est coloré dans une solution d'acide perchlorique à 3,4 % et de bleu de Coomassie R 250 à 0,04 %, pendant 24 à 48 heures (Reisner et coll., 1975).

Décoloration

Cette dernière est réalisée dans un mélange contenant 500 ml d'eau, 150 ml de méthanol et 50 ml d'acide acétique.

3.2.4. ÉTUDE DU POIDS MOLÉCULAIRE.

Le poids moléculaire de l'HPSM a été déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, par comparaison avec d'autres protéines de poids moléculaire connu: cytochrome C ($PM \approx 12.500$), chymotrypsinogène ($PM \approx 25.000$), albumine de blanc d'oeuf ($PM \approx 45.000$), sous-unité de l'aldolase ($PM \approx 39.500$), albumine sérique bovine ($PM \approx 68.000$).

3.2.5. ÉTUDE DU POINT ISOÉLECTRIQUE

3.2.5.1. ÉTUDE DU pH_i PAR UNE SÉRIE D'ÉLECTROPHORÈSES RÉALISÉES À DIFFÉRENTS pH .

Utilisant la méthode publiée par Longsworth (1941), nous avons réalisé plusieurs électrophorèses de

l'HPSM à différents pH : pH 8,3 en Tris-glycine 0,5 M; pH 6,9 en Tris-acide acétique; pH 5,8 en tampon phosphate de sodium et à pH 4,6 en acétate de sodium.

A pH 4,6, l'HPSM s'insolubilise et l'électrophorèse est impossible.

3.2.5.2. ETUDE DU pHi PAR FOCALISATION ISOELECTRIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

La focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide est réalisée de la manière décrite précédemment.

Directement après la migration, le gel est coupé en deux sur toute sa longueur.

Une moitié est découpée transversalement en petits fragments de 5 mm de long. Ceux-ci sont incubés séparément pendant 2 heures dans des tubes contenant 2 ml d'eau désionisée. Passé ce délai, le pH de chaque échantillon est déterminé et reporté sur papier millimétré en vue d'établir une échelle de pH.

3.3. RESULTATS

3.3.1. HOMOGÉNÉITÉ DE LA PRÉPARATION D'HPSM

3.3.1.1. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

La Fig.8 représente l'image de migration d'une préparation d'HPSM purifiée en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Elle montre son homogénéité de charge et permet la comparaison avec la prolactine (PRL-NIH-B4) et l'hormone de croissance (GH-NIH-B18).

3.3.1.2. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS

L'image électrophorétique présentée à la Fig.12 montre que la préparation d'HPSM est également homogène selon le critère de la taille moléculaire.

3.3.1.3. FOCALISATION ISOELECTRIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'image de la migration de la préparation d'HPSM purifiée, en focalisation isoélectrique permet de repérer une bande principale entourée de deux autres bandes d'intensité plus faible. (Fig.13).

3.3.2. POIDS MOLÉCULAIRE (PM)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide, réalisée en présence de SDS permet de situer le poids moléculaire de l'HPSM aux environs de 33.000 daltons (Fig.12). Ce résultat est obtenu en comparant la migration de l'HPSM à celle de différentes protéines de poids moléculaire connu.

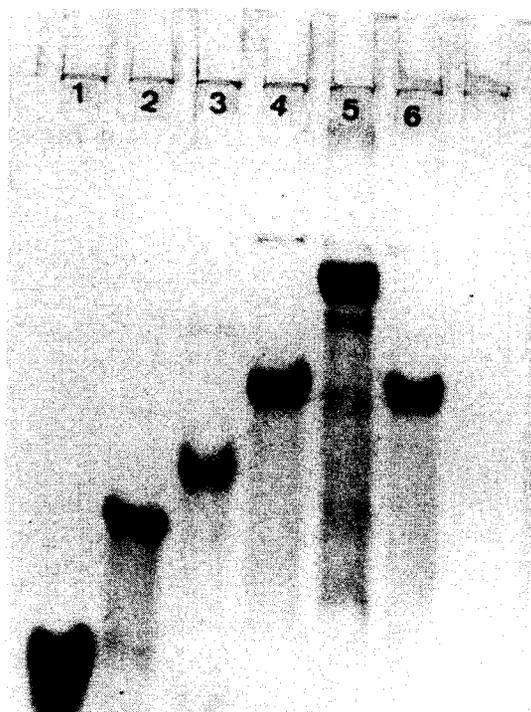
3.3.3. POINT ISOÉLECTRIQUE (PHI)

Le point isoélectrique de l'HPSM a été déterminé par une série d'électrophorèses réalisées à différents pH : 8,3 ; 6,9 et 5,8 (Fig.14). L'utilisation d'un pH plus acide (4,8) s'est révélée impossible car la protéine s'insolubilise.

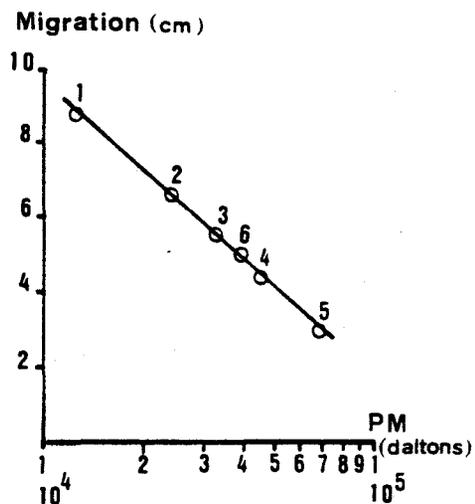
Cette méthode permet, néanmoins, de situer le point isoélectrique de notre préparation d'HPSM aux environs de 5,2.

En focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide, la bande la plus intense correspond au pH de 5,2 (Fig.13).

Fig.12 - ÉLECTROPHORÈSE DE L'HPSM EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS;
DÉTERMINATION DE SON PM PAR COMPARAISON À DES PROTÉINES
CONNUES.



DETERMINATION DU PM



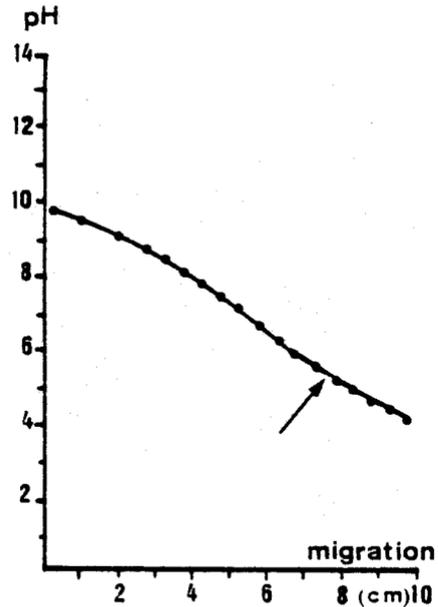
Les chiffres inscrits sur la photo et dans le graphique correspondent aux protéines suivantes:

- 1= cytochrome C :PM \approx 12.500 daltons;
- 2= chymotrypsinogène: PM \approx 25.000 daltons;
- 3= hormone placentaire somato-mammotrope;
- 4= albumine de blanc d'oeuf : PM \approx 45.000 daltons;
- 5= albumine sérique bovine: PM \approx 68.000 daltons;
- 6= sous-unité de l'aldolase: PM \approx 39.500 daltons.

Fig.13 - FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE DE L'HPSM PURIFIÉE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.



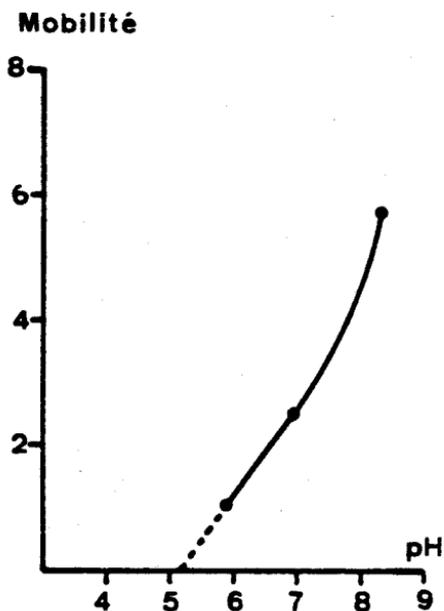
DETERMINATION DU PHi



La focalisation isoélectrique représentée sur la photo a été réalisée dans les conditions décrites dans le texte en utilisant des ampholytes de pH 4 à 6;5. La courbe de pH représentée à droite est issue d'une focalisation isoélectrique réalisée en présence d'ampholytes de pH 3 à 10.

→: endroit où se trouve l'HPSM en fin de migration.

Fig. 14 - DÉTERMINATION DU POINT ISOÉLECTRIQUE (pH_i) DE L'HPSM PAR LA RÉALISATION, À pH DIFFÉRENTS, DE PLUSIEURS ÉLECTROPHORÈSES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.



En abscisse: pH (en unité)

En ordonnée: mobilité (μ . sec.⁻¹ par V.cm⁻¹) ou $\frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{sec.}} \times 10^{-4}$

Au cours de ces différentes électrophorèses réalisées à pH décroissants (8,3; 6,9 et 5,8) la mobilité de l'HPSM a été établie selon la formule suivante:

$$\text{mobilité} = \frac{\text{vitesse}}{\text{champ}}$$

3.4. DISCUSSION

L'homogénéité de la préparation d'HPSM a été contrôlée par différentes techniques : électrophorèse, électrophorèse en présence de SDS et enfin focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide. Si les deux premières techniques plaident en faveur d'une homogénéité parfaite de la préparation, la troisième révèle une certaine hétérogénéité due à la présence de deux fractions mineures. Ces dernières pourraient correspondre à des formes de déamidation de la protéine, à moins qu'elles ne reflètent l'existence d'isohormones comme cela a été décrit pour l'hormone de croissance humaine (Yadley et coll., 1973).

Deux méthodes différentes nous ont permis de fixer le point isoélectrique de l'HPSM à $\approx 5,2$. Ce résultat diffère peu de celui de Hayden et Forsyth (1979) ($pH_i = 5,3$) et de celui de Bolander et Fellows (1976) ($pH_i = 5,9$).

En ce qui concerne le poids moléculaire de l'HPSM, notre résultat (≈ 33.000 daltons) concorde avec les travaux de Bremel et coll. (1980) mais diffère de ceux de Bolander et Fellows (1976) qui attribuent à l'HPSM un poids moléculaire de 22.150, de ceux de Roy et coll. (1977) qui évaluent son poids moléculaire à 60.000 et enfin de ceux de Hayden et Forsyth (1979) qui le situent à 45.000 daltons. Ces auteurs ont établi le poids moléculaire de l'HPSM par chromatographie sur gel (filtration moléculaire). Notre expérience montre cependant que cette méthode fournit le plus souvent un profil élargi centré sur des poids moléculaires variant de ≈ 30.000 à ≈ 60.000 . Selon toute vraisemblance, ces profils élargis sont dus à des agrégats de molécules intactes ou de fragments de molécules d'HPSM. Ce phénomène explique probablement la variabilité de la valeur du poids moléculaire rapportée par

ces différents auteurs. C'est la raison pour laquelle nous avons retenu — comme méthode de détermination du poids moléculaire — l'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS après solubilisation de la préparation hormonale — hautement purifiée et très active — en SDS et 2-Mercaptoéthanol.

La valeur du poids moléculaire que nous avons déterminée, soit 33.000 daltons, laisse entrevoir une grande différence entre l'HPSM et les hormones hypophysaires apparentées: l'hormone de croissance bovine, qui comporte 191 acides aminés et présente un poids moléculaire de 21.600 (Wallis, 1973) ainsi que la prolactine bovine, qui comprend 199 acides aminés et présente un poids moléculaire de 22.500 (Wallis, 1974).

A ce propos, il paraît intéressant de rappeler l'hypothèse de Njall et coll. (1971) suggérant l'existence d'un petit peptide ancestral à l'origine de toutes les hormones lactogéniques et somatotropes, qu'elles soient d'origine hypophysaire ou placentaire. Ce peptide qui, initialement était constitué de 25 à 50 acides aminés, aurait subi plusieurs duplications géniques au cours de l'évolution. En effet, la duplication des gènes est considérée comme un moyen habituel de diversification génétique au cours de l'évolution des vertébrés (Dayhoff, 1972).

Les hormones hypophysaires et placentaires déjà étudiées, telles l'hPRL, l'oPRL et l'hGH, dans lesquelles quatre zones d'homologie interne se retrouvent, contiendraient 4 fois ce peptide ancestral; il est possible que l'HPSM dont le poids moléculaire est de 33.000 daltons en comprennent 6 répliques. Cette proposition reste évidemment conjecturale.

Cette particularité de structure de l'HPSM est compatible avec une activité hormonale bifonctionnelle très élevée, ainsi que le montrent les résultats de nos recherches ultérieures.

CHAPITRE IV

4. ETUDE DE LA LIAISON DE L'HPSM AUX RECEPTEURS MEMBRANAIRES DE LAPINE GESTANTE.

4.1. INTRODUCTION

Tout au long des différentes étapes de la purification, nous avons repéré l'HPSM, en mesurant son activité prolactinique et somatotrope, dans les dosages de la prolactine et de l'hormone de croissance, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. Les courbes de dilution, des différentes préparations d'HPSM, ne sont pas parallèles à celles des standards de référence PRL-NIH-B4 et GH-NIH-B18 (Fig.10 et Fig.11).

Cette observation nous a amenés à étudier la liaison de l'HPSM aux récepteurs membranaires de lapines gestantes.

Dans un premier temps, cette étude implique le marquage de l'hormone à l'iode 125 et la caractérisation de l'hormone radioactive.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé le comportement de l'HPSM purifiée à celui de l'HPSM native. En effet, le grand nombre d'étapes nécessaires à la purification de l'HPSM pouvait nous faire craindre une dénaturation partielle de l'hormone, susceptible de modifier sa liaison aux récepteurs.

Dans un troisième temps, nous avons caractérisé et comparé entre elles, les liaisons de l'HPSM, de l'hormone de croissance et de la prolactine aux récepteurs hépatiques et mammaires de lapine gestante. Cette étude se justifie du fait de l'activité bifonctionnelle de l'HPSM, capable de se lier à la fois aux récepteurs somatotropes et aux récepteurs mammatropes.

4.2. MATERIELS ET METHODES

4.2.1. RADIOMARQUAGE DE L'HPSM À L'IODE 125

L'HPSM a été marquée à l'iode 125 suivant la méthode à la lactoperoxydase de Thorell et Johansson(1971) dans les proportions de 2,5 et 5 µg d'hormone pour 1 mCi d'iode 125. La technique a été décrite en détail au paragraphe 1.2.1.1., page 34.

4.2.2. PRÉPARATION DES FRACTIONS TISSULAIRES RICHES EN RÉCEPTEURS.

Ces dernières ont été préparées exactement de la même manière que pour les dosages de la prolactine et de l'hormone de croissance (paragraphe 1.2.1.2., page 35).

4.2.3. PRÉPARATION DE L'HPSM NATIVE

L'hormone native a été préparée de la manière suivante:

- les cotylédons foetaux et maternels sont broyés pendant environ une minute et extraits dans un rapport poids/volume de 1/5 en tampon glycine 0,05 M ajusté à pH 7,5 par de l'hydroxyde de sodium et additionné de chlorure de

sodium 9 g/litre;

- l'extraction est poursuivie pendant une heure à la température de 4°C puis la solution est clarifiée par centrifugation à 13.000 g pendant 40 minutes à 4°C.

Ce mode d'extraction a été choisi en vue d'éviter toute dénaturation de l'hormone.

4.2.4. MESURE DE LA LIAISON DE L'HPSM AUX RÉCEPTEURS

4.2.4.1. RECEPTEURS HEPATIQUES

L'incubation est réalisée dans des tubes de cristal de polystyrène (75 x 13 mm); les réactifs sont ajoutés dans l'ordre suivant:

- 100 µl d'HPSM radiomarkée correspondant à 15.000 cpm;
- 100 µl de suspension de récepteurs correspondant à 140 µg de protéines;
- 100 µl de la dilution d'hormone froide ou de la solution à doser;
- 200 µl de tampon.

Les tubes sont incubés durant 16 heures à 20°C.

Après centrifugation et lavage du culot, la radioactivité est déterminée au moyen d'un compteur gamma.

4.2.4.2. RECEPTEURS MAMMAIRES.

Les conditions de ce dosage sont identiques à celles du précédent mais la suspension de récepteurs hépatiques est remplacée par 100 µl de récepteurs mammaires correspondant à 180 µg de protéines.

4.2.5. DESCRIPTION DES METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS

4.2.5.1. ANALYSE DU PARALLELISME DES COURBES D'INHIBITION

L'analyse du parallélisme des courbes

d'inhibition en représentation logit/log a été réalisée en 2 étapes:

- détermination des pentes des courbes d'inhibition
- test de "t" pour évaluer la signification des différences de pentes entre les diverses préparations d'une part et de la courbe de référence d'autre part.

Cette analyse a été réalisée au moyen de programmes sur ordinateur (IBM 370 Université de Liège) mis au point selon Rodbard et coll. (Rodbard, 1973; Rodbard, 1974; Rodbard et Frazier, 1973; Rodbard et Lewald, 1970 et Feldman, 1972).

4.2.5.2. ANALYSE DES DONNEES EXPERIMENTALES OBTENUES A L'EQUILIBRE: DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'ASSOCIATION (K_a) ET DU NOMBRE DE SITES DE FIXATION.

Les études, que nous avons entreprises pour caractériser l'interaction hormone-récepteur se sont limitées à l'analyse des données expérimentales à l'équilibre. Les courbes de saturation à l'équilibre sont obtenues en incubant des quantités croissantes d'hormone radiomarquée ou d'un mélange d'hormone radioactive et d'hormone "froide" avec une quantité constante de suspension de récepteurs. Lorsque l'équilibre est atteint (soit après 16 heures à 20°C), les quantités d'hormone liée aux récepteurs et d'hormone libre sont mesurées. A partir des courbes de saturation - à l'équilibre -, il est possible de calculer la constante d'association à l'équilibre (K_a) et la concentration en sites de fixation, présents dans le milieu d'incubation.

Le plus souvent, ces données sont analysées en utilisant la représentation de Scatchard (1949). Dans cette méthode, les rapports entre les concentrations d'hormones liée et libre sont exprimés en fonction des concentrations d'hormone liée aux récepteurs. Ainsi, dans les graphiques de Scatchard, les concentrations d'hormone liée ou de "complexes" hormone-récepteurs (B/pM) figurent en abscisse, tandis

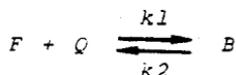
que les rapports entre les concentrations d'hormones liée et libre (B/F) apparaissent en ordonnée.

Les résultats de nos expériences ont été analysés au moyen de l'ensemble de programmes MLAB (On -Line Modeling Laboratory) élaborés par G.D. Knott, D.K. Reece et R.I. Shrager (Knott et Reece, 1972; Knott et Shrager, 1972). Ces programmes d'ordinateur permettent d'ajuster un modèle mathématique aux données expérimentales sur base d'une procédure de régression non linéaire. De plus, une représentation graphique sur écran vidéo permet l'évaluation de modèles mathématiques ainsi que des résultats d'un calcul de régression (comparaison des courbes d'ajustement avec les données expérimentales).

La Fig. 15 représente les différents types de graphiques de Scatchard, correspondant aux résultats de nos expériences.

Graphiques de Scatchard linéaires.

Dans le cas de graphiques de Scatchard linéaires (Fig. 15A) l'interaction hormone-récepteur peut être assimilée à une simple réaction bimoléculaire réversible:



où

F = concentration en hormone, non liée ou libre (M)

Q = concentration en récepteurs libres (M)

B = concentration en complexes hormone-récepteur (M) ou concentration en hormone liée

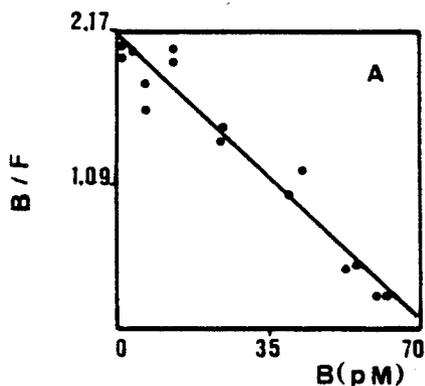
k_1 = constante de vitesse d'association ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$)

k_2 = constante de vitesse de dissociation (min^{-1})

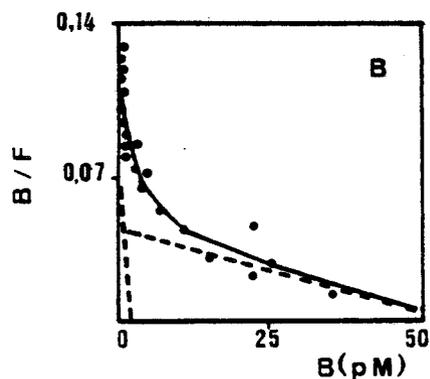
La constante d'association à l'équilibre, K_a (M^{-1}) est définie par la loi d'action des masses:

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{B}{F \cdot Q}$$

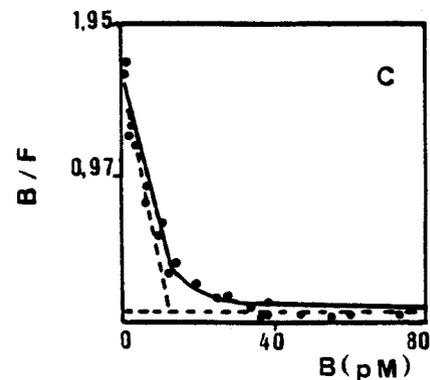
Fig. 15- REPRÉSENTATION GRAPHIQUE, SELON SCATCHARD, POUR L'ANALYSE DES CONCENTRATIONS D'HORMONES LIBRE ET LIÉE À L'ÉQUILIBRE.



Le graphique de Scatchard est linéaire: l'interaction hormone-récepteurs est analysée sur la base d'un modèle de réaction bimoléculaire simple réversible.



Le graphique de Scatchard est curviligne; il est décomposé en deux droites représentées en pointillés. L'interaction hormone-récepteurs est analysée sur la base d'un modèle de réaction où l'hormone interagit avec deux populations de récepteurs d'affinités différentes.



Le graphique de Scatchard est curviligne; il est décomposé en deux droites représentées en pointillés: une des droites est parallèle à l'axe des abscisses; elle correspond à la fixation de l'hormone à un compartiment de faible affinité et de capacité infinie, l'autre droite est oblique, elle représente l'interaction hormone-récepteurs.

dont on peut tirer l'équation " de Scatchard " :

$$\frac{B}{F} = K_a (Q_0 - B)$$

B/F = rapport des concentrations d'hormone liée au récepteur et des concentrations d'hormone libre.

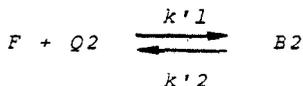
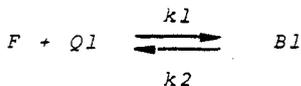
Q_0 = concentration totale en sites récepteurs (M)

Lorsque B/F est représenté en fonction de B , une droite est obtenue (Fig.15 A) dont la pente équivaut à $-K_a$ tandis que l'intersection avec l'axe des abscisses correspond à Q_0 .

Graphiques de Scatchard curvilignes.

Dans les cas où les graphiques de Scatchard sont curvilignes (Fig.15 B et C), les données expérimentales ne sont pas compatibles avec un modèle bimoléculaire simple; des modèles plus complexes basés sur l'existence de plusieurs populations de sites récepteurs doivent être utilisés.

Par exemple, si l'on postule que l'hormone se lie à deux populations de sites de fixation d'affinités différentes, l'équation s'écrit comme suit:



$$B = B_1 + B_2$$

où

Q_1 et Q_2 = concentrations en sites récepteurs libres (M)

B , B_1 et B_2 = concentrations en complexes hormone-récepteurs (M)

La loi d'action des masses permet d'écrire les équations suivantes:

$$Ka_1 = \frac{k_1}{k_2} = \frac{B_1}{F.Q_1} \quad \text{et} \quad Ka_2 = \frac{k'_1}{k'_2} = \frac{B_2}{F.Q_2}$$

où Ka_1 et Ka_2 représentent les constantes d'équilibre des deux réactions.

Le graphique de Scatchard curviligne peut être décomposé en deux droites représentées sur la Fig.15 B en pointillés. La pente de chacune de ces droites équivaut à $-Ka$ et leur intersection avec l'axe des abscisses correspond aux Q_0 .

L'équation qui rend compte d'un tel système peut s'exprimer comme suit:

$$\frac{B}{F} = \frac{1}{2} \left\{ \left[Ka_1(Q_1 - B) + Ka_2(Q_2 - B) \right] + \sqrt{Ka_1 \left[(Q_1 - B) - Ka_2(Q_2 - B) \right]^2 + 4Ka_1Ka_2Q_1Q_2} \right\}$$

Dans ce cas, "B/F" représente le rapport de la somme des concentrations en complexes hormones-récepteurs (B) sur la concentration d'hormone libre (F).

Un cas particulier de graphique de Scatchard curviligne se rencontre assez fréquemment; il s'explique par la coexistence d'une seule population de sites récepteurs indépendants et d'un compartiment de capacité infinie et d'affinité faible. Cette situation s'observe en cas de sous-estimation systématique de la liaison non spécifique (confer 1.2.3.3., page 39) (Rodbard, 1973). Dans ce cas également, le graphique

de Scatchard curviligne peut être décomposé en deux droites représentées en pointillés sur la Fig.15 C. L'une est parallèle à l'axe des abscisses, elle représente la fixation de l'hormone à un compartiment de capacité infinie et de faible affinité.

L'autre droite, oblique, nous ramène à la situation décrite antérieurement (Fig.15 A), elle permet de déterminer la constante d'association à l'équilibre (K_a) et la concentration totale des sites de fixation spécifiques de l'hormone ($Q_0;M$).

L'équation permettant l'analyse d'une telle situation s'écrit comme suit:

$$\frac{B}{F} = \frac{1}{2} \left\{ K_a(Q_0 - B) + Y + \sqrt{[K_a(Q_0 - B) + Y]^2 + 4 K_a B Y} \right\}$$

où Y représente l'intersection de la droite horizontale en pointillés (asymptote horizontale de la courbe) avec l'axe des ordonnées.

L'analyse des concentrations à l'équilibre - pour en extraire la constante d'association à l'équilibre et le nombre total de sites de fixation - suppose que certaines conditions soient remplies:

- l'interaction hormone-récepteurs est réversible;
- la réaction est à l'équilibre lorsque les concentrations en hormones liée et libre sont mesurées;
- il n'existe pas d'interaction entre récepteurs (pas de coopérativité positive ni négative) en d'autres termes, tous les sites sont indépendants;
- les hormones "froide" et radioactive sont indistinguables du point de vue des récepteurs et sont dispersées uniformément dans le milieu;
- le complexe hormone-récepteurs peut être séparé complètement de l'hormone libre sans perturbation de l'équilibre;

- aucune dégradation n'altère ni l'hormone "froide" ni l'hormone radioactive, ni les récepteurs, au cours des manipulations expérimentales (dilutions, incubation, séparation).

4.3. RESULTATS

4.3.1. LIAISON DE L'HPSM RADIOACTIVE AUX RÉCEPTEURS

4.3.1.1. LIAISON DE L'HPSM ¹²⁵I AUX RECEPTEURS HEPATIQUES

Les caractéristiques de la liaison de l'HPSM ¹²⁵I, aux récepteurs hépatiques, sont les suivantes:

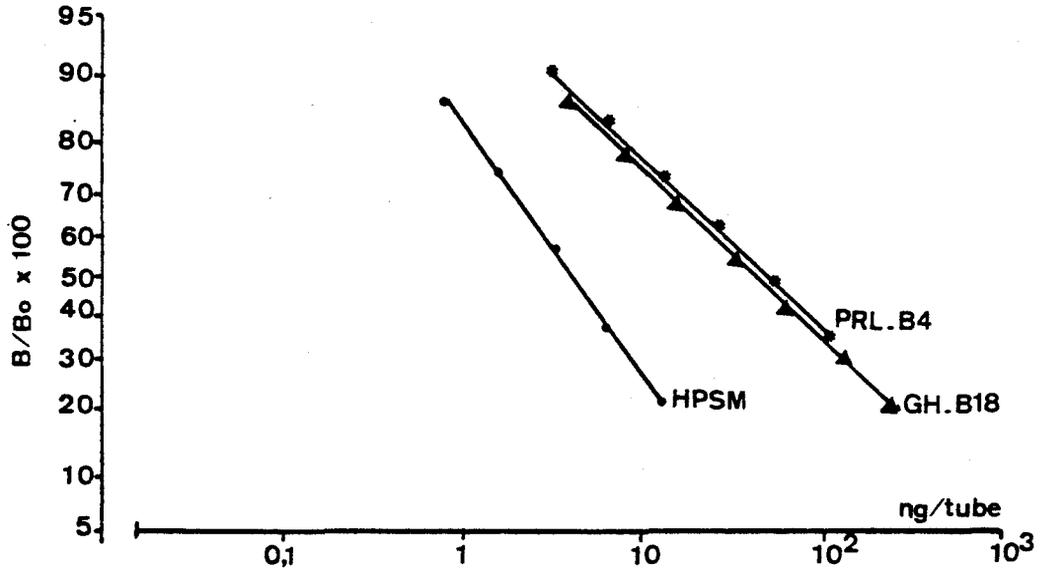
- la liaison non spécifique est de 460 cpm, soit $\approx 3 \%$ de la radioactivité totale;
- la liaison spécifique de l'hormone radiomarkée en absence d'hormone *froide* est de 22 %;
- la liaison spécifique maximum en présence d'un excès de récepteurs (600 μ g de protéines par tube) est de 45 %.

Cette méthode permet une détection très sensible de l'HPSM (310 pg/tube). Cependant elle n'est pas spécifique: l'hormone de croissance et la prolactine entrent en compétition avec l'HPSM radiomarkée pour la liaison aux récepteurs mais selon des courbes d'inhibition non parallèles à celle de l'HPSM (Fig.16). Cette différence de pente ne permet pas de comparer quantitativement les activités de ces hormones (confer Fig.11, page 80).

4.3.1.2. LIAISON DE L'HPSM ¹²⁵I AUX RECEPTEURS MAMMAIRES

Les caractéristiques de la liaison de l'HPSM ¹²⁵I, aux récepteurs mammaires, sont les suivantes:

Fig.16 - LIAISON DE L'HPSM ¹²⁵I AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES HÉPATIQUES DE LAPINE GESTANTE; INHIBITION PAR L'HPSM ,LA PROLACTINE ET L'HORMONE DE CROISSANCE.



Caractéristiques: T \approx 15.000 cpm HPSM ¹²⁵I; NSB = 460 cpm \approx 3 %;
Bo/T \approx 22 %; Bmax/T \approx 46 %.

En abscisse: (échelle logarithmique). Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle logit) B/Bo x 100.

Hormone	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 % (ng/tube)	Dose minimale produisant une inhibition (ng/tube)
HPSM	- 1,16	2,50 \pm 0,05	0,69
Prolactine	- 0,82*	30,60 \pm 0,90	5,04
Hormone de croissance	- 0,81*	25,50 \pm 0,70	7,06

* Pente significativement différente (P < 0,05) de celle obtenue pour la courbe d'inhibition par l'HPSM purifiée.

- la liaison non spécifique est de 425 cpm et correspond à $\approx 2,8 \%$ de la radioactivité totale;
- la liaison spécifique de l'hormone radiomarquée en absence d'hormone *froide* est de 26 %;
- la liaison spécifique maximum en présence d'un excès de récepteurs (700 μ g de protéines par tube) est de 55 %.

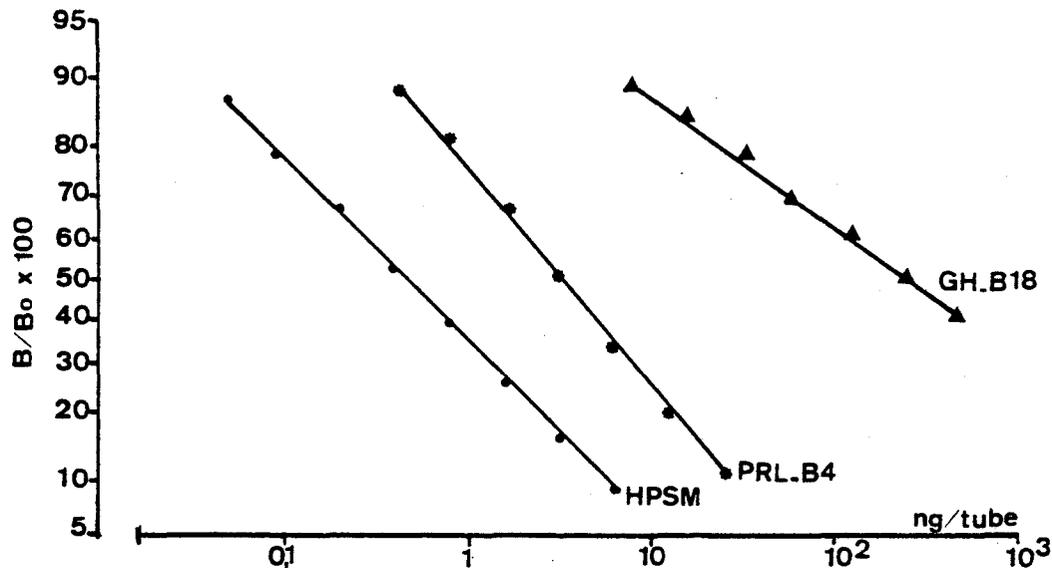
Cette méthode permet une détection extrêmement sensible de l'HPSM (20 pg/tube). Cependant, elle n'est pas spécifique vis-à-vis de la prolactine ni de l'hormone de croissance (Fig.17). En effet, ces hormones hypophysaires entrent en compétition avec l'HPSM selon une courbe non parallèle (confer Fig.10, page 79).

4.3.2. ETUDE COMPARATIVE DE L'HPSM PURIFIÉE ET DE L'HPSM NATIVE PRÉSENTE DANS LES COTYLÉDONS.

Dans les dosages par liaison radiocompétitive, tant aux récepteurs hépatiques que mammaires, l'HPSM purifiée se comporte comme l'HPSM native. En représentation logit, les pentes des courbes de dilution sont parallèles (Fig.18 et 19).

Il n'y a pas de différence statistiquement significative ($P < 0,05$) entre les pentes des courbes d'inhibition par l'HPSM purifiée et l'HPSM native. Cette dernière est représentée par plusieurs extraits de cotylédons foetaux et maternels (tableaux 7 A et 7 B).

Fig. 17- LIAISON DE L'HPSM ¹²⁵ I AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE; INHIBITION PAR L'HPSM, LA PROLACTINE ET L'HORMONE DE CROISSANCE.



Caractéristiques: $T \approx 15.000$ cpm HPSM ¹²⁵ I; NSB = 425 cpm $\approx 2,8$ %;
 $B_0/T \approx 26$ %; $B_{max}/T \approx 55$ %.

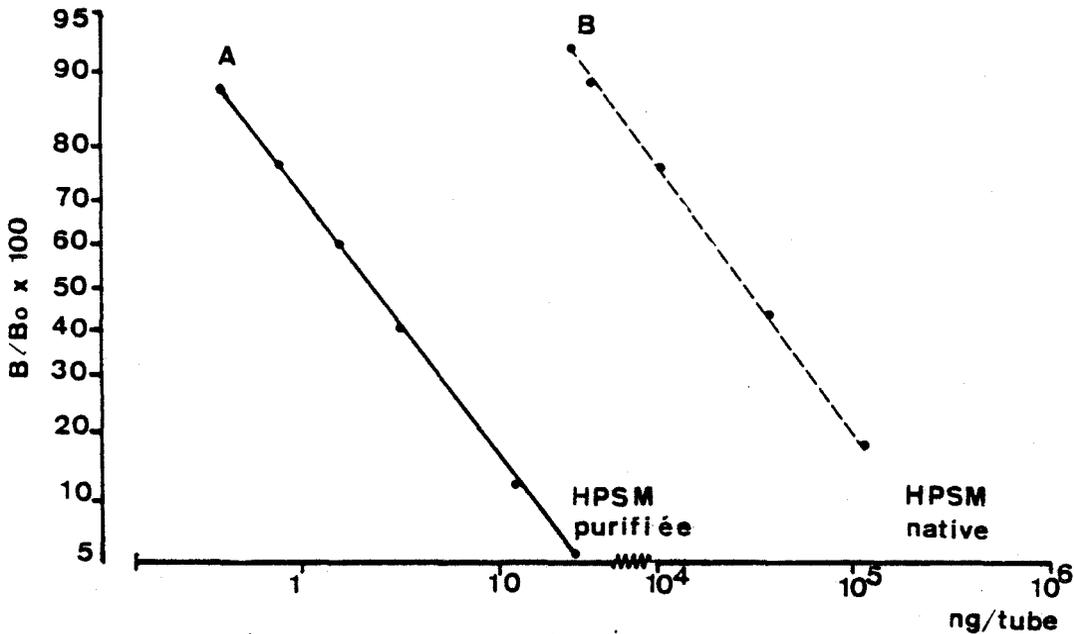
En abscisse: (échelle logarithmique). Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle logit). $B/B_0 \times 100$.

Hormone	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 % (ng/tube)	Dose minimale produisant une inhibition (ng/tube)
HPSM	- 0,86	$0,43 \pm 0,01$	0,02
Prolactine	- 1,03*	$3,12 \pm 0,09$	0,11
Hormone de croissance	- 0,61*	$257,65 \pm 11,62$	14,53

* Pente significativement différente ($P < 0,05$) de celle obtenue pour la courbe d'inhibition par l'HPSM purifiée.

Fig.18 - LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE DE L'HPSM AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES HÉPATIQUES; COMPARAISON DE L'HORMONE PURIFIÉE À L'HORMONE NATIVE.



Caractéristiques: T = 15.000 cpm HPSM¹²⁵I; NSB = 460 cpm ≈ 3 %;
Bo/T ≈ 22 %; Bmax/T ≈ 46 %

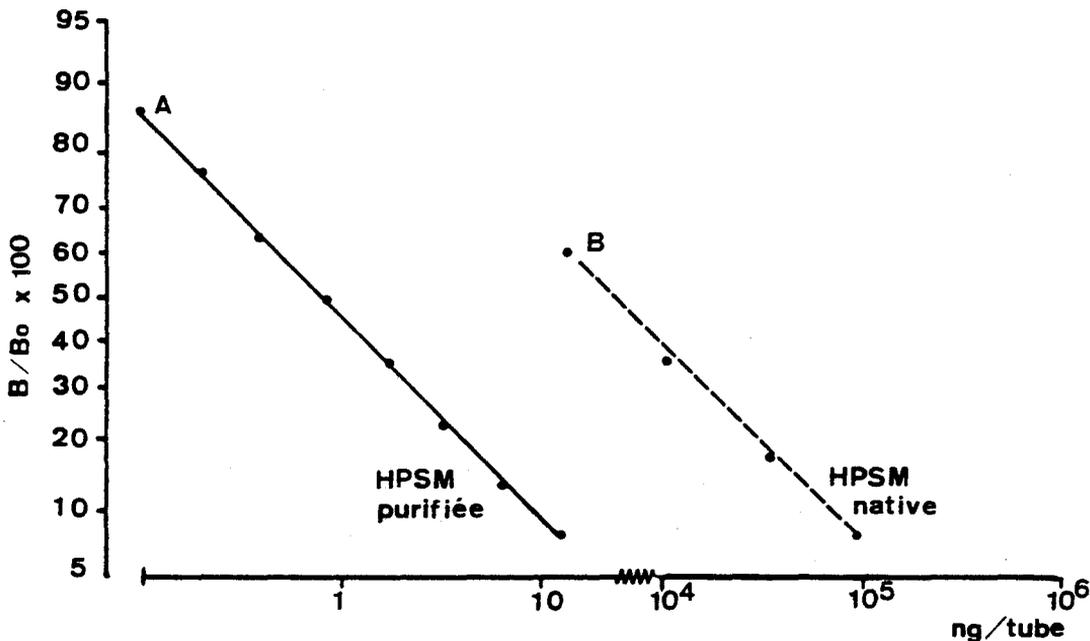
En abscisse: (échelle logarithmique). Quantité de protéines, additionnées au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle logit) B/Bo x 100.

— = HPSM purifiée

- - - = HPSM native, extraite de cotylédons maternels.

Fig. 19 - LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE DE L'HPSM AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES MAMMAIRES: COMPARAISON DE L'HORMONE PURIFIÉE À L'HORMONE NATIVE.



Caractéristiques: T \approx 15.000 cpm HPSM ^{125}I ; NSB = 425 cpm \approx 2,8 %;
Bo/T \approx 26 %; Bmax/T \approx 55 %.

En abscisse: (échelle logarithmique). Quantité de protéines, additionnées au milieu (ng/tube) .

En ordonnée: (échelle logit) B/Bo x 100 .

— = HPSM purifiée

- - - = HPSM native, extraite de cotylédons maternels.

Tableau 7 - ÉTUDE COMPARATIVE DE L'HPSM PURIFIÉE ET DE L'HORMONE NATIVE EXTRAITE DES COTYLÉDONS.

A. LIAISON RADIOCOMPETITIVE AUX RECEPTEURS HEPATIQUES

Préparation hormonale	Pente	Quantité de protéines produisant une inhibition de 50 % de la liaison	Activité de l'extrait en % de l'HPSM purifiée
HPSM purifiée	- 1,16	2,25 (\pm 0,06) ng	100.
Extrait de cotyl.foet.	- 1,05*	3,06 (\pm 0,09) μ g	73 x 10 ⁻³
Extrait de cotyl.foet.	- 1,23*	3,92 (\pm 0,12) μ g	57 x 10 ⁻³
Extrait de cotyl.mat.	- 1,22*	27,15 (\pm 0,80) μ g	82 x 10 ⁻⁴
Extrait de cotyl.mat.	- 1,20*	32,09 (\pm 0,94) μ g	70 x 10 ⁻⁴

B. LIAISON RADIOCOMPETITIVE AUX RECEPTEURS MAMMAIRES

Préparation hormonale	Pente	Quantité de protéines produisant une inhibition de 50 % de la liaison	Activité de l'extrait en % de l'HPSM purifiée
HPSM purifiée	- 0,89	0,82 (\pm 0,02) ng	100
Extrait de cotyl.foet.	- 0,93*	0,98 (\pm 0,03) μ g	83 x 10 ⁻³
Extrait de cotyl.foet.	- 0,95*	1,03 (\pm 0,03) μ g	79 x 10 ⁻³
Extrait de cotyl.mat.	- 0,94*	7,99 (\pm 0,29) μ g	100 x 10 ⁻⁴
Extrait de cotyl.mat.	- 0,92*	10,55 (\pm 0,41) μ g	77 x 10 ⁻⁴

* Aucune de ces pentes n'est significativement différente ($P < 0,05$) de celle de la courbe d'inhibition par l'HPSM purifiée.

4.3.3. ETUDE COMPARATIVE DES LIAISONS DE L'HPSM, DE LA PROLACTINE ET DE L'HORMONE DE CROISSANCE AUX RÉCEPTEURS HÉPATIQUES ET MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE.

4.3.3.1. LIAISON DE L'HPSM AUX RECEPTES HEPATIQUES

La Fig.20 représente les graphiques selon Scatchard caractérisant la liaison de l'HPSM aux récepteurs hépatiques. L'équilibre est réalisé en présence d'une HPSM marquée d'une radioactivité spécifique de 7,5 $\mu\text{Ci}/\text{pmole}$. Le graphique A est curviligne, il peut être décomposé en deux droites représentées en pointillés. L'asymptote horizontale peut être expliquée par une estimation incomplète de la liaison non spécifique.

Le graphique B obtenu à partir de la courbe d'*auto-inhibition* est linéaire. Cette différence est probablement due au fait que dans le premier cas (A) la concentration totale en hormone (*froide* + radioactive) atteint des valeurs beaucoup plus élevées et de ce fait révèle la population de sites à faible affinité, reflet de l'erreur d'appréciation de la liaison non spécifique (NSB). Dans les deux cas, la valeur de la constante d'association à l'équilibre ainsi que la concentration totale en sites récepteurs ne diffèrent pratiquement pas.

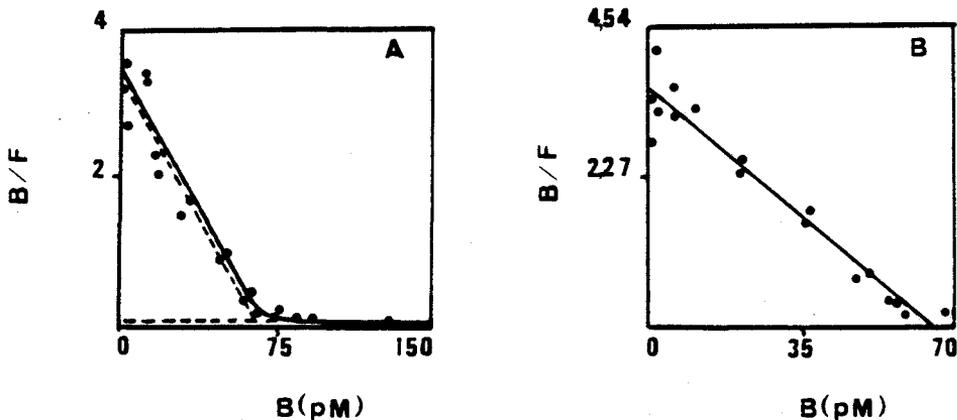
Calculés - sur la base des concentrations, en hormone libre et liée, mesurées à l'équilibre - à partir de la courbe d'inhibition (Fig.20 A), les paramètres de la liaison présentent les valeurs suivantes:

- la constante d'association à l'équilibre est de $5,1 (\pm 0,4) \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$
- le nombre de sites est de $276 (\pm 18) \text{ fmoles /mg-de protéines}^*$

Calculés - sur base des concentrations, en hormone libre et liée, mesurées à l'équilibre - à partir de la courbe

* Protéines dosées par la méthode de Lowry et coll.(1951) après solubilisation en présence de SDS.

Fig. 20- CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE L'HPSM AUX RÉCEPTEURS HÉPATIQUES DE LAPINE GESTANTE.



Conditions: - 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 140 μ g de protéines;

- conditions d'incubation : 16 heures à 20°C.

Caractéristiques: NSB = 460 cpm \approx 3 %; $B_0/T \approx$ 22 %; $B_{max}/T \approx$ 46 %

En abscisse: HPSM liée (pM)

En ordonnée: HPSM liée/HPSM libre

A : graphique selon Scatchard , établi à partir de la courbe d'inhibition

B : graphique selon Scatchard, établi à partir de la courbe d' *auto-inhibition*.

d'auto-inhibition (Fig.20 B), les paramètres de la liaison présentent les valeurs suivantes:

- la constante d'association à l'équilibre est de $5,7(\pm 0,3) \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$
- le nombre de sites est de $259 (\pm 10)$ fmoles/mg de protéines.

Afin de révéler une influence éventuelle du niveau de la radioactivité spécifique de l'hormone radiomarquée sur l'équilibre de la liaison hormone-récepteurs, nous avons repris cette expérience en utilisant une HPSM ^{125}I d'une radioactivité spécifique de $16,5 \mu\text{Ci}/\text{pmole}$.

Déterminés sur base de la courbe d'inhibition;

- la constante d'association à l'équilibre est de $4,9 (\pm 0,1) \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $186 (\pm 4)$ fmoles /mg de protéines.

Déterminés sur base de la courbe d'auto-inhibition;

- la constante d'association à l'équilibre est de $3,0(\pm 0,4) \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $292 (\pm 13)$ fmoles/mg de protéines.

4.3.3.2. LIAISON DE L'HORMONE DE CROISSANCE AUX RECEPTEURS HEPATIQUES.

La liaison de l'hormone de croissance (bGH-NIH-B18) au tissu hépatique de lapine gestante a été utilisée pour la mise au point du dosage de cette hormone, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires (Tsushima et Friesen,1973). En présence de la prolactine notamment, cette liaison ne présente qu'une spécificité relative ainsi que nous l'avons signalé antérieurement (Fig.4, page 48). Cependant, elle permet la détection sensible d'une activité somatotrope. Dès lors, il nous a paru intéressant d'étudier les caractéristiques de cette liaison pour la comparer à celle de l'HPSM.

Les graphiques selon Scatchard permettent de déterminer les valeurs de la constante d'association et du nombre de sites à l'équilibre.

Calculés sur base de la courbe d'inhibition(Fig.21 A), ces paramètres sont les suivants:

- la constante d'association à l'équilibre est de $1,34 (\pm 0,17) \times 10^{10} M^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de 694 (± 61) fmoles/mg de protéines.

Calculés sur base de la courbe d'auto-inhibition(Fig. 21 B), leurs valeurs sont les suivantes:

- la constante d'association à l'équilibre est de $1,30 (\pm 0,12) \times 10^{10} M^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de 855 (± 57) fmoles/mg de protéines.

4.3.3.3. LIAISON DE LA PROLACTINE AUX RECEPTEURS HEPATIQUES

A titre comparatif, nous avons également étudié la liaison de la prolactine (bPRL-NIH-B4) aux récepteurs hépatiques. En effet, les cellules hépatiques de lapines gestantes comportent des sites de liaison pour la prolactine (Shiu et Friesen,1974).

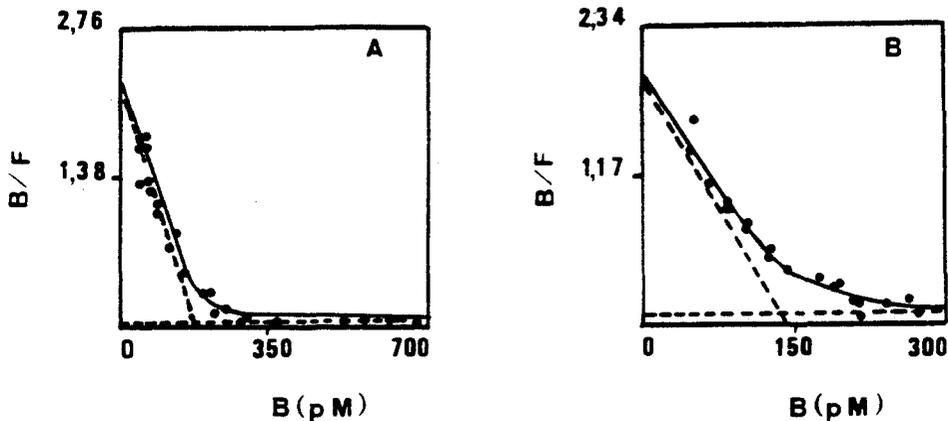
La représentation graphique des concentrations d'hormone libre et liée, à l'équilibre, selon le modèle de Scatchard permet de calculer les paramètres de la liaison:

- Calculés sur base de la courbe d'inhibition(Fig.22 A)
- la constante d'association à l'équilibre est de $3,2 (\pm 0,6) \times 10^9 M^{-1}$;
 - le nombre de sites de liaison est de 368 (± 40) fmoles/mg de protéines.

Calculés sur base de la courbe d'auto-inhibition (Fig.22 B);

- la constante d'association à l'équilibre est de $4,5 (\pm 1,0) \times 10^9 M^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de 249 (± 46) fmoles/mg de protéines.

Fig.21 - CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE L'HORMONE DE CROISSANCE AUX RÉCEPTEURS HÉPATIQUES DE LAPINE GESTANTE.



Conditions:- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 100 μ g de protéines;

- conditions d'incubation: 16 heures à 20°C.

Caractéristiques: NSB = 500 cpm \approx 3 %; $B_0/T \approx 17,5$ %; $B_{max}/T \approx 39$ %

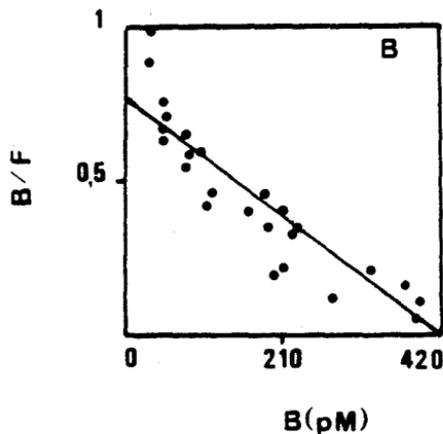
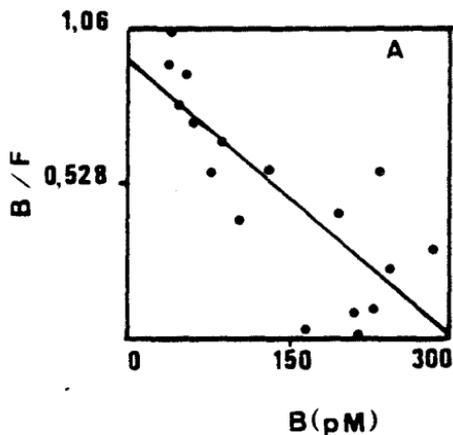
En abscisse: hormone de croissance liée (pM)

En ordonnée: hormone de croissance liée/ hormone de croissance libre

A: Diagramme selon Scatchard, établi à partir de la courbe d'inhibition

B: Diagramme selon Scatchard, établi à partir de la courbe d' auto-inhibition.

Fig.22 - CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE LA PROLACTINE AUX RÉCEPTEURS HÉPATIQUES DE L'APINE GESTANTE.



Conditions: - 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 400 μ g de protéines.

- conditions d'incubation: 16 heures à 20°C.

Caractéristiques: NSB = 1.045 cpm \approx 6,5 %; $B_0/T \approx$ 17 %;
 $B_{max}/T \approx$ 29 %

En abscisse: prolactine liée (pM)

En ordonnée: prolactine liée/prolactine libre.

A : graphique selon Scatchard établi à partir de la courbe d'inhibition

B : graphique selon Scatchard, établi à partir de la courbe d'auto-inhibition.

4.3.3.4. LIAISON DE L'HPSM AUX RECEPTEURS MAMMAIRES

Pour la première série d'expériences, nous avons utilisé une préparation d'HPSM ^{125}I d'une radioactivité spécifique de 7,5 $\mu\text{Ci}/\text{pmole}$.

Calculés sur base de la courbe d'inhibition (Fig.23 A)

- la constante d'association à l'équilibre est de $8,8 (\pm 0,9) \times 10^{11} \text{M}^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $51 (\pm 4) \text{fmoles}/\text{mg}$ de protéines.

Calculés sur base de la courbe d'auto-inhibition;

- la constante d'association à l'équilibre est de $14,5 (\pm 3,6) \times 10^{11} \text{M}^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $45 (\pm 10) \text{fmoles}/\text{mg}$ de protéines.

Pour la seconde série d'expériences, nous avons utilisé une préparation d'HPSM ^{125}I d'une radioactivité spécifique de 16,5 $\mu\text{Ci}/\text{pmole}$.

Calculés sur base de la courbe d'inhibition;

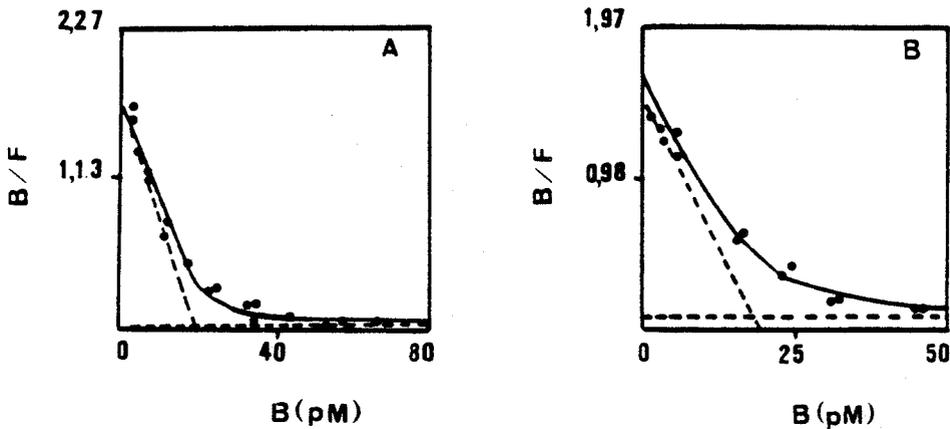
- la constante d'association à l'équilibre est de $12,1 (\pm 1,1) \times 10^{11} \text{M}^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $31 (\pm 2) \text{fmoles}/\text{mg}$ de protéines.

Calculés sur base de la courbe d'auto-inhibition

(Fig.23 B);

- la constante d'association à l'équilibre est de $7,9 (\pm 0,2) \times 10^{11} \text{M}^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $48 (\pm 13) \text{fmoles}/\text{mg}$ de protéines.

Fig. 23 - CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE L'HPSM AUX RÉCEPTEURS MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE,



Conditions: - 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 180 μ g de protéines;
- conditions d'incubation: 16 heures à 20°C.

Caractéristiques: NSB = 425 cpm \approx 3 %; $B_0/T \approx$ 26 %; $B_{max}/T \approx$ 55%

En abscisse: HPSM liée (pM)

En ordonnée: HPSM liée/HPSM libre

A : diagramme selon Scatchard, établi à partir de la courbe d'inhibition

B : diagramme selon Scatchard, établi à partir de la courbe d'auto-inhibition.

4.3.3.5. LIAISON DE LA PROLACTINE AUX RECEPTEURS MAMMAIRES

Sur la base des concentrations à l'équilibre, en hormones libre et liée, les graphiques selon Scatchard, calculés à partir de la courbe d'inhibition par l'hormone *froide* (graphique A) ou de la courbe d'*auto-inhibition* par l'hormone radiomarquée (graphique B) permettent d'estimer les valeurs des paramètres de la liaison.

Calculés sur base de la courbe d'inhibition (Fig.24 A);

- la constante d'association à l'équilibre est de $7,4(\pm 1,1) \times 10^9 M^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $720 (\pm 83)$ fmoles/mg de protéines.

Calculés sur base de la courbe d'*auto-inhibition*

(Fig.24 B);

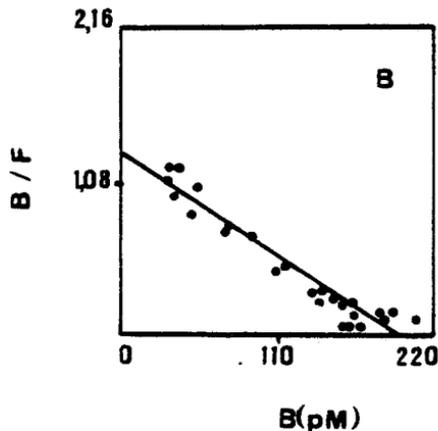
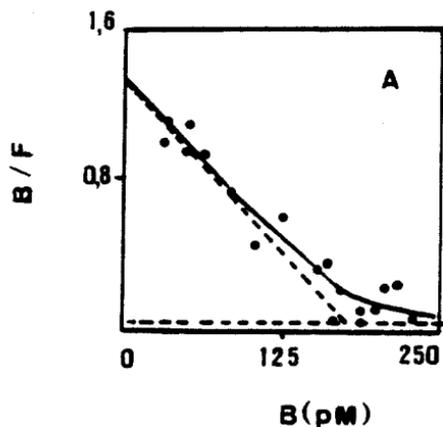
- la constante d'association à l'équilibre est de $6,9(\pm 3,6) \times 10^9 M^{-1}$;
- le nombre de sites de liaison est de $760 (\pm 18)$ fmoles/mg de protéines.

4.4. DISCUSSION

Marquée à l'iode 125 , notre préparation d'HPSM se lie aux récepteurs membranaires dans une proportion importante ($\approx 50\%$). Cette caractéristique de l'hormone radiomarquée laisse entrevoir la mise au point d'un dosage radioimmunologique dans des conditions favorables.

En outre, la préparation d'HPSM ^{125}I présente une radioactivité spécifique très élevée. De ce fait, utilisée comme *traceur* dans les dosages par liaison radiocompétitive elle permet la détection de faibles quantités d'hormone:

Fig.24 - CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE LA PROLACTINE AUX RÉCEPTEURS MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE.



Conditions: - 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 120 μ g de protéines;

- conditions d'incubation: 16 heures à 20°C.

Caractéristiques: NSB = 440 cpm \approx 3 %; $B_0/T \approx$ 23 %; $B_{max}/T \approx$ 42%

En abscisse: prolactine liée (pM)

En ordonnée: prolactine liée/ prolactine libre

A: graphique selon Scatchard, établi à partir de la courbe d'inhibition

B: graphique selon Scatchard, établi à partir de la courbe d'auto-inhibition.

(= 300 pg en présence de récepteurs hépatiques, = 20 pg en présence de récepteurs mammaires).

Les pentes des courbes d'inhibition - de la fixation de l'HPSM radiomarquée aux récepteurs hépatiques ou mammaires - produites par l'HPSM purifiée et l'HPSM native extraite de cotylédons de placentas frais, sont identiques. Cette observation démontre que l'HPSM purifiée n'a pas été dénaturée au cours des différentes étapes de l'isolement.

Ces qualités de nos préparations d'HPSM purifiée, froide et radioactive, nous ont permis de poursuivre la caractérisation de la liaison de l'HPSM, aux récepteurs hépatiques et mammaires et, de comparer cette liaison à celle de la prolactine et de l'hormone de croissance.

Les expériences et les calculs devant servir de base à ces comparaisons sont réalisés en tenant compte de la *fraction intacte* de l'hormone radiomarquée et de sa radioactivité spécifique propre. Cette précaution permet la convergence de résultats obtenus à partir d'expériences différentes.

Le type de compétition - courbe d'inhibition ou d'*auto-inhibition* - n'influence pas la valeur des paramètres de la liaison tant en ce qui concerne l'HPSM, la prolactine et l'hormone de croissance (tableaux 8 et 9).

Par ailleurs, en ce qui concerne l'HPSM et dans les limites de notre étude, le niveau de la radioactivité spécifique de l'hormone radiomarquée n'interfère pas sur la liaison de celle-ci aux récepteurs hépatiques ou mammaires: la constante d'association à l'équilibre et le nombre de sites de liaison sont à peu près identiques dans les deux cas.

Le tableau 8, permet de comparer les liaisons de l'HPSM, de l'hormone de croissance et de la prolactine, à une suspension tissulaire identique, le foie de lapine gestante.

Tableau 8- COMPARAISON DE LA LIAISON DE L'HPSM, DE L'HORMONE DE CROISSANCE ET DE LA PROLACTINE AUX RÉCEPTEURS HÉPATIQUES DE LAPINE GESTANTE.

Hormones	Radioactivité spécifique ($\mu\text{Ci/pmole}$)	Type de compétition	$K_a(M^{-1})$	Nbre de sites (fmoles/mg)
HPSM	élevée (7,50)	inhibition	$5,1 \times 10^{11}$	276
	élevée (7,50)	<i>auto-inhibition</i>	$5,7 \times 10^{11}$	259
HPSM	très élevée (16,50)	inhibition	$4,9 \times 10^{11}$	186
	très élevée (16,50)	<i>auto-inhibition</i>	$3,0 \times 10^{11}$	292
Hormone de croissance	faible (0,35)	inhibition	$1,3 \times 10^{10}$	694
	faible (0,35)	<i>auto-inhibition</i>	$1,3 \times 10^{10}$	853
Prolactine	faible (0,36)	inhibition	$3,2 \times 10^9$	368
	faible (0,36)	<i>auto-inhibition</i>	$4,5 \times 10^9$	249

Tableau 9- COMPARAISON DE LA LIAISON DE L'HPSM ET DE LA PROLACTINE AUX RÉCEPTEURS
MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE.

Hormones	Radioactivité spécifique ($\mu\text{Ci}/\text{pmole}$)	Type de compétition	$K_a(M^{-1})$	Nbre de sites (fmoles/mg)
HPSM	élevée (7,50)	inhibition	$8,8 \times 10^{11}$	51
	élevée (7,50)	<i>auto-inhibition</i>	$14,5 \times 10^{11}$	45
HPSM	très élevée (16,50)	inhibition	$12,1 \times 10^{11}$	31
	très élevée (16,50)	<i>auto-inhibition</i>	$7,9 \times 10^{11}$	48
Prolactine	faible (0,36)	inhibition	$7,4 \times 10^9$	720
	faible (0,36)	<i>auto-inhibition</i>	$6,9 \times 10^9$	760

Comparée à celle de l'hormone de croissance, la liaison de l'HPSM se caractérise par une constante d'association à l'équilibre ≈ 40 fois plus élevée et un nombre de sites de fixation ≈ 3 fois plus faible.

Comparée à celle de la prolactine, la liaison de l'HPSM présente une constante d'association à l'équilibre ≈ 120 fois plus élevée et un nombre de sites à peu près semblable (≈ 250 pour ≈ 300). Dans notre expérience, la prolactine se lie aux récepteurs hépatiques avec une faible affinité; cette observation pourrait remettre en question l'utilisation de ce type de récepteur pour le dosage de la prolactine. Rappelons que ce système fut pourtant préconisé par Parke et Forsyth (1975).

Le tableau 9 permet de comparer la liaison de l'HPSM et celle de la prolactine à une suspension tissulaire identique, la glande mammaire de lapine gestante.

Par rapport à celle de la prolactine, la liaison de l'HPSM se caractérise par une constante d'association à l'équilibre ≈ 116 fois plus élevée et un nombre de sites de fixation 15 fois plus faible.

Enfin une comparaison de la fixation de l'HPSM aux récepteurs hépatiques et aux récepteurs mammaires (tableau 10) fait apparaître que l'hormone se lie aux seconds avec une affinité supérieure (2 à 3 fois plus élevée). Cette observation est en accord avec les différences de sensibilité des dosages par radiocompétition: la liaison de l'HPSM ^{125}I aux récepteurs mammaires permet de détecter 20 pg d'hormone *froide* tandis que sa liaison aux récepteurs hépatiques permet seulement la détection de quantités supérieures à 300 pg.

Notre étude de la liaison de l'HPSM, aux récepteurs membranaires hépatiques et mammaires de lapine gestante, confirme le caractère bifonctionnel de l'hormone. L'hormone

Tableau 10 - COMPARAISON DE LA LIAISON DE L'HPSI¹ AUX RÉCEPTEURS HÉPATIQUES ET MAMMAIRES DE LAPINE GESTANTE.

Récepteurs	Radioactivité spécifique ($\mu\text{Ci/pmole}$)	Type de compétition	$K_a(M^{-1})$	Nbre de sites (fmoles/mg)
Hépatiques	élevée (7,50)	inhibition	$5,1 \times 10^{11}$	276
	élevée (7,50)	<i>auto-inhibition</i>	$5,7 \times 10^{11}$	259
	très élevée (16,50)	inhibition	$4,9 \times 10^{11}$	186
	très élevée (16,50)	<i>auto-inhibition</i>	$3,0 \times 10^{11}$	292
Mammaires	élevée (7,50)	inhibition	$8,8 \times 10^{11}$	51
	élevée (7,50)	<i>auto-inhibition</i>	$14,5 \times 10^{11}$	45
	très élevée (16,50)	inhibition	$12,1 \times 10^{11}$	31
	très élevée (16,50)	<i>auto-inhibition</i>	$7,9 \times 10^{11}$	48

placentaire somato-mammotrope bovine est capable de se lier avec une affinité très élevée, aux récepteurs de type somatotrope (hépatiques) et aux récepteurs de type prolactinique (mammaires).

En même temps, cette étude fait apparaître les qualités de nos préparations d'HPSM purifiée et d'HPSM radiomarkée (HPSM¹²⁵I). La première présente, vis-à-vis des récepteurs, un comportement identique à celui de l'hormone native présente dans les cotylédons. La seconde possède une radioactivité spécifique élevée, compatible avec une conservation satisfaisante (50 %) de sa capacité maximale de liaison aux récepteurs. De surcroît, les caractéristiques de sa liaison aux récepteurs (constante d'association à l'équilibre, nombre de sites de liaison) sont équivalentes à celles de l'hormone *froide*.

Enfin, notre étude comparative des liaisons de l'HPSM, de la prolactine et de l'hormone de croissance, aux récepteurs hépatiques et mammaires de lapine gestante en fait clairement apparaître toutes les différences. Cette étude confirme la nullité de toute comparaison d'activité hormonale spécifique au sein de systèmes hétérologues, notamment en absence de parallélisme des courbes *dose-effet*.

5. MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DE SITES RECEPTEURS DE TYPE SOMATOTROPE ET DE TYPE PROLACTINIQUE CHEZ LA VACHE.

5.1. INTRODUCTION

A ce stade de notre recherche, nous disposons d'une préparation d'HPSM hautement purifiée (chapitre III) et douée d'une activité bifonctionnelle prolactinique et somatotrope élevée (chapitre II).

Nos études, entreprises pour caractériser la liaison de l'HPSM aux récepteurs membranaires de lapines gestantes (chapitre IV), nous ont permis de préciser les éléments suivants:

- notre préparation d'HPSM ^{125}I présente une *fraction intacte* très satisfaisante;
- elle possède une radioactivité spécifique élevée;
- dans les limites où il a été étudié, le niveau de radioactivité spécifique n'affecte pas la liaison de l'hormone radiomarquée;
- l'HPSM ^{125}I se lie avec grande affinité aux récepteurs hépatiques et aux récepteurs mammaires;
- en tenant compte de la radioactivité spécifique et de la *fraction intacte* de l'hormone radioactive, il est possible de caractériser sa liaison aux récepteurs aussi bien sur base de courbes d'inhibition que d'*auto-inhibition*.

Ces qualités de nos préparations d'HPSM purifiée et d'HPSM radioactive nous permettaient d'envisager une

étude des sites de liaison de type somatotrope et de type prolactinique chez la vache.

En principe, nous aurions du réaliser une étude exhaustive en traitant tous les tissus, nous nous sommes cependant limités aux organes cibles les plus typiques de la prolactine et de l'hormone de croissance. La description d'une liaison de l'hPL au corps jaune de bufflonnes (Moodbidri et coll., 1973) et de la prolactine aux glandes surrénales de lapins (Shiu et Friesen, 1974) ainsi qu'à l'endomètre de brebis (Chan et coll., 1978b) nous a poussés à étudier également ces tissus chez la vache.

5.2. MATERIELS ET METHODES

5.2.1. PRÉPARATION DES FRACTIONS TISSULAIRES.

L'obtention des fractions riches en membranes cellulaires s'est révélée plus difficile que pour les organes de lapine gestante.

Les différents essais effectués montrent que la méthode d'homogénéisation en sucrose 0,3 M suivie de deux centrifugations préparatives selon Shiu et coll. (1973) est en principe applicable pour tous les organes. Toutefois, lorsque la glande contient beaucoup de tissu fibreux, (glande mammaire), il faut au préalable la hacher finement dans de la glace pilée.

Nos investigations ont porté sur le foie, le tissu adipeux, le corps jaune, la glande mammaire, l'endomètre et les glandes surrénales.

5.2.2. MODE OPÉRATOIRE POUR METTRE EN ÉVIDENCE UNE LIAISON DE L'HORMONE AUX SITES RÉCEPTEURS,

Toutes ces expériences sont réalisées de la même manière que pour l'étude des récepteurs membranaires de lapine gestante, tant en ce qui concerne le radiomarquage des hormones que les conditions d'incubation (confer 1.2., page 34).

Les préparations tissulaires de vache énumérées plus haut ont toutes été mises en présence de l'HPSM ¹²⁵I. Pour certaines d'entre elles, nous avons également étudié leurs liaisons à la prolactine, à l'hormone de croissance et à la lutropine radiomarquées.

5.2.3. ÉTUDE DES CARACTÉRISTIQUES DE LIAISONS

Comme antérieurement, les résultats ont été analysés suivant le modèle graphique de Scatchard (1949) traité mathématiquement par ordinateur (confer 4.2.5.2., page 102).

5.3. RESULTATS

5.3.1. MISE EN ÉVIDENCE DES SITES RÉCEPTEURS

Nous avons observé que la concentration de sites récepteurs à l'HPSM est toujours faible quel que soit l'organe envisagé. Leur présence a cependant été détectée au niveau de la glande mammaire, du corps jaune, du foie, de l'endomètre et du tissu adipeux; elle n'a pas été retrouvée au niveau de la glande surrénale (tableau 11).

Tableau 11 - POURCENTAGE DE LIAISON SPÉCIFIQUE* DE L'HPSM, DE LA PROLACTINE, DE L'HORMONE DE CROISSANCE ET DE LA LUTROPINE RADIOACTIVES À DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS TISSULAIRES DE BOVIN,

Homogénat tissulaire de	HPSM	Hormone de croissance	Prolactine	Lutropine
Glande mammaire de génisse impubère (a)	<1,0 %	<1,0 %	≈3,5 %	-
Glande mammaire de génisse non gestante(a)	≈5,5 %	≈2,5 %	≈3,5 %	-
Glande mammaire d'une vache gestante de 6 mois (a)	≈5,6 %	≈3,5 %	≈6,5 %	-
Glande mammaire d'une vache gestante de 7 mois (b)	≈10,5 %	≈6,7 %	≈14,5 %	-
Corps jaunes de vache gestante et non gestante (a)	≈22,7 %	≈3,5 %	≈2,8 %	≈39,5 %
Foie de vache non gestante(a)	≈26,5 %	≈25,3 %	≈1,0 %	-
Surrénale de vache gestante (a)	<1,0 %	<1,0 %	<1,0 %	-
Endomètre de vache gestante (a)	≈7,2 %	≈3,5 %	<1,0 %	-
Tissu adipeux de vache gestante (a)	≈10,4 %	-	-	-

* L'incubation est réalisée pendant 16 heures à 20°C dans un volume de 500 µl: 15.000 cpm d'hormone radiomarquée sont mis en présence de ≈ 1 µg de suspension de récepteurs(Lowry SDS). La liaison non spécifique est mesurée en incubant ces mêmes réactifs en présence d'un excès (≈ 1 µg) d'hormone "froide".

(a) préparation des homogénats selon la méthode habituelle.

(b) homogénéisation préalable en présence de glace pilée dans un hache viande électrique.

5.3.2. CARACTÉRISTIQUES DES SITES RÉCEPTEURS

La liaison de l'HPSM aux sites de fixation de divers tissus des bovins est caractérisée par la détermination de la constante d'association à l'équilibre et du nombre de sites.

En outre, cette étude est complétée par l'analyse de l'influence que la prolactine et l'hormone de croissance pouvaient exercer sur la liaison de l'HPSM radiomarquée.

5.3.2.1. LIAISON DE L'HPSM AUX SITES RECEPTEURS HEPATIQUES DE VACHE GESTANTE.

La constante d'association à l'équilibre (K_a) est de $6,7 \times 10^9 M^{-1}$ et le nombre de sites de liaison est de 8,5 fmoles/mg de protéines. Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que pour les récepteurs préparés à partir du foie de lapine gestante.

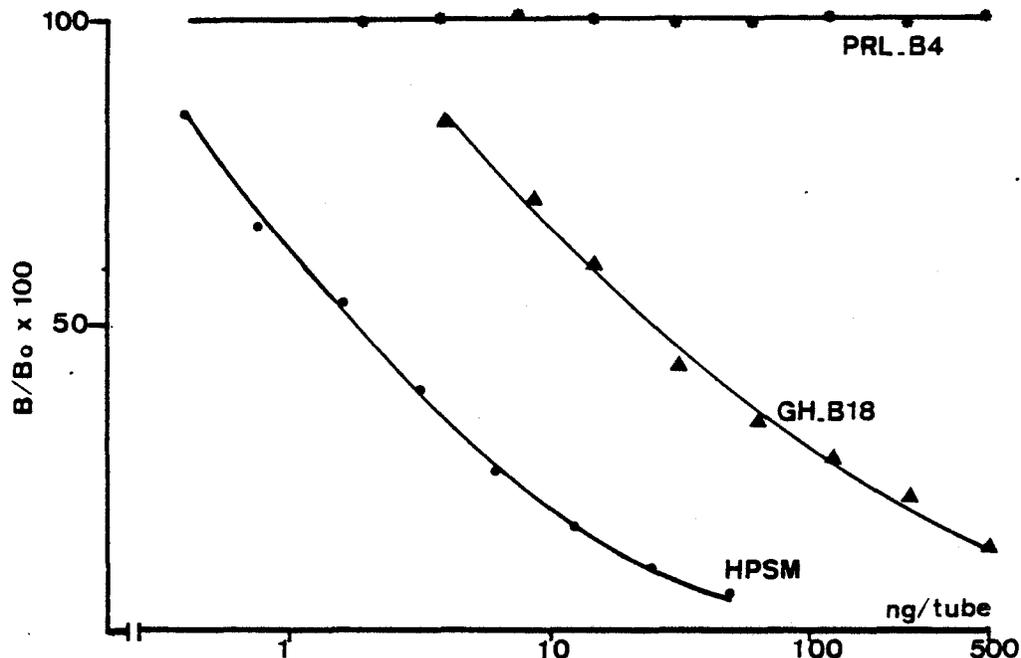
Seule l'hormone de croissance interfère dans la liaison (Fig.25). Cette caractéristique laisse supposer l'absence de récepteurs à prolactine dans le foie de bovins. Nous avons confirmé cette observation en incubant de la prolactine radiomarquée avec une suspension de récepteurs hépatiques et en constatant l'absence de liaison (tableau 11).

5.3.2.2. LIAISON DE L'HPSM AUX SITES RECEPTEURS DE L'ENDOMETRE.

Dans ce cas, la constante d'association à l'équilibre (K_a) est de $9,3 \times 10^9 M^{-1}$ et le nombre de sites est de 13,3 fmoles/mg de protéines.

La Fig.26 montre également que l'hormone de croissance interfère dans la liaison tandis que la prolactine reste sans

Fig.25 - INHIBITION DE LA LIAISON DE L'HPSM RADIOACTIVE AUX SITES RÉCEPTEURS HÉPATIQUES DE VACHE GESTANTE PAR L'HPSM, L'HORMONE DE CROISSANCE ET LA PROLACTINE.



Conditions: - 100 μ l d'HPSM radiomarquée correspondant à \approx 15.000 cpm

- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à \approx 1,1 mg de protéines

Caractéristiques: NSB = 525 cpm \approx 3,5 %; Bo/T \approx 12 %

En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

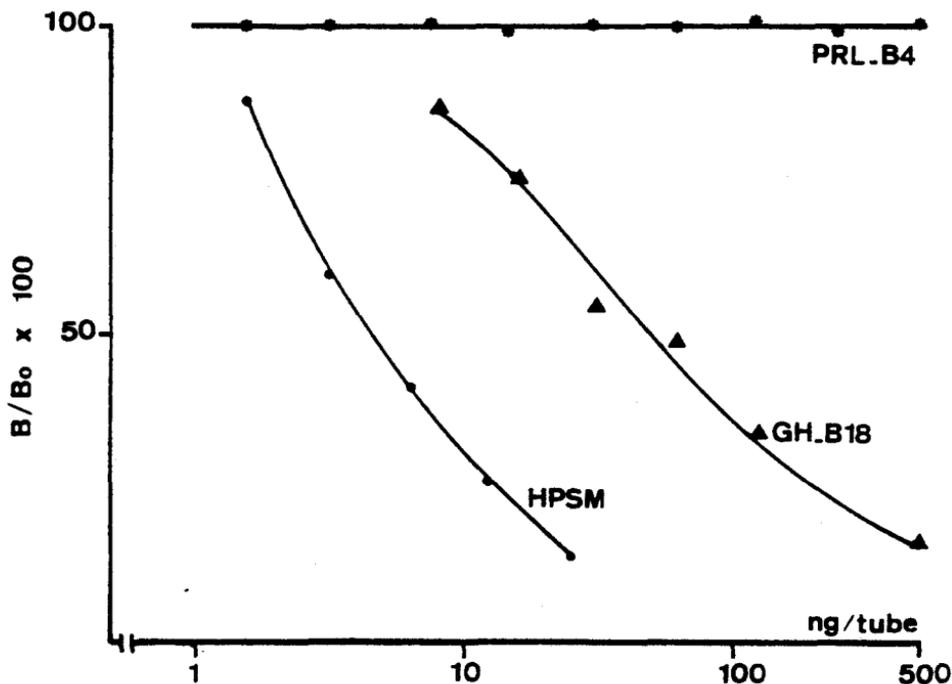
En ordonnée: (échelle arithmétique) B/Bo x 100.

• = HPSM

▲ = hormone de croissance bGH-NIH-818

• = prolactine bPRL-NIH-84

Fig.26 - INHIBITION DE LA LIAISON DE L'HPSM RADIOACTIVE AUX SITES RÉCEPTEURS DE L'ENDOMÈTRE DE VACHE NON GESTANTE PAR L'HPSM, L'HORMONE DE CROISSANCE ET LA PROLACTINE.



Conditions: - 100 μ l d'HPSM radiomarquée correspondant à \approx 15.000 cpm
- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à \approx 270 μ g de protéines.

Caractéristiques: NSB = 380 cpm \approx 2,5 % ; Bo/T \approx 7 %

En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone *froide*, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle arithmétique) B/Bo x 100.

- = HPSM
- ▲ = hormone de croissance bGH-NIH-B18
- = prolactine bPRL-NIH-B4

effet. La prolactine marquée ne se lie pas non plus à cette préparation de récepteurs.

5.3.2.3. LIAISON DE L'HPSM AUX SITES RECEPTEURS DU CORPS JAUNE

La constante d'association à l'équilibre (K_a) est de $8,4 \times 10^9 M^{-1}$ et le nombre de sites est de 3,1 fmoles/mg de protéines.

L'hormone de croissance interfère dans cette liaison, tandis que la prolactine n'a aucun effet. (Fig.27). Cette constatation plaide en faveur de l'hypothèse selon laquelle la prolactine aurait peu d'action lutéotrope chez la vache (Karg et coll.,1970; Hoffmann,1977).

Il faut également remarquer la très faible interférence de la LH sur cette liaison ce qui laisse supposer que l'HPSM et la LH occupent des sites tout-à-fait différents au niveau du corps jaune.

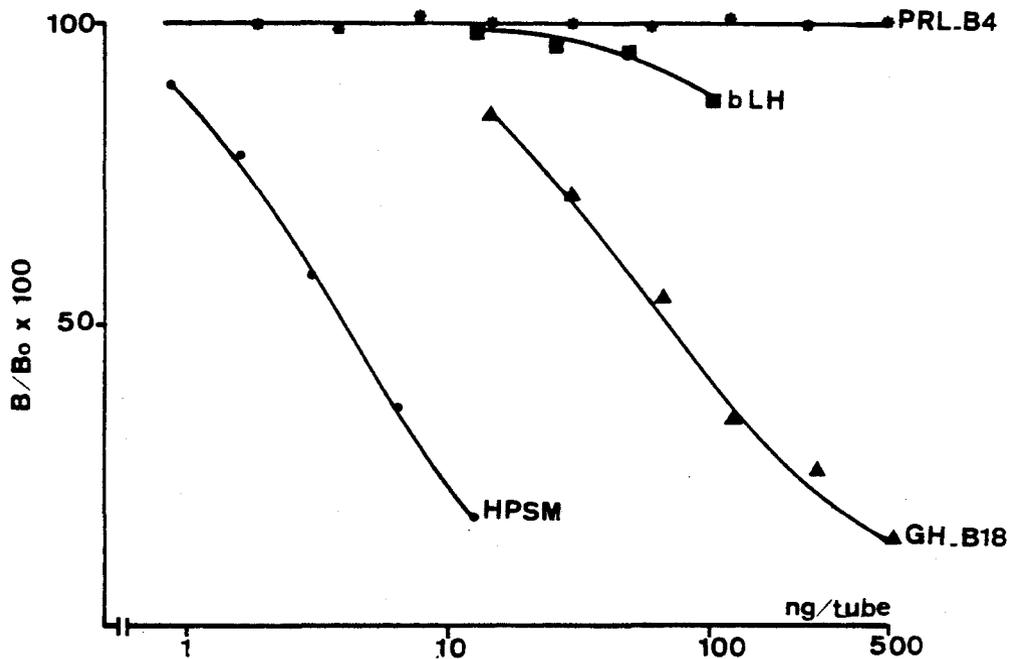
5.3.2.4. LIAISON DE L'HPSM AUX SITES RECEPTEURS DE LA GLANDE MAMMAIRE.

Ainsi qu'il apparaît dans la Fig.28, la liaison de l'HPSM ¹²⁵I est inhibée par l'HPSM froide mais aussi par les deux hormones hypophysaires apparentées: la prolactine et l'hormone de croissance.

L'analyse des concentrations en hormone libre et en hormone liée, à l'équilibre, est réalisée sur la base de la courbe d'inhibition, de la manière décrite antérieurement (confer 4.2.5.2.,page 102).

Le graphique selon Scatchard (Fig.29 A) est curviligne; il peut être décomposé en deux droites, représentées en pointillés. Cette analyse fait apparaître deux populations

Fig. 27 INHIBITION DE LA LIAISON DE L'HPSM RADIOACTIVE AUX SITES RÉCEPTEURS DU CORPS JAUNE DE VACHES GESTANTES PAR L'HPSM, L'HORMONE DE CROISSANCE, LA LH ET LA PROLACTINE.



Conditions: - 100 μ l d'HPSM radiomarquée correspondant à \approx 15.000 cpm.

- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à \approx 1,2 mg de protéines.

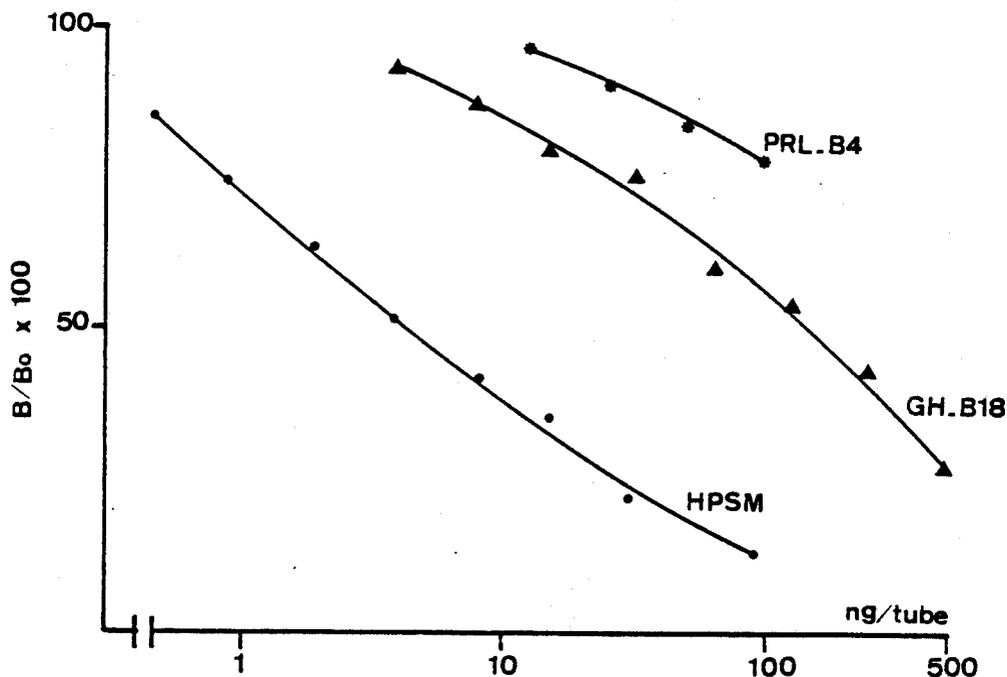
Caractéristiques: NSB = 480 cpm \approx 3 %; Bo/T \approx 8 %

En abscisse: (échelle logarithmique) . Quantité d'hormone *froide*, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle arithmétique) B/Bo x 100.

- = HPSM
- ▲ = hormone de croissance bGH-NIH-B18
- = prolactine bPRL-NIH-B4
- = lutropine

Fig. 28 - INHIBITION DE LA LIAISON DE L'HPSM RADIOMARQUÉE AUX SITES RÉCEPTEURS MAMMAIRES DE VACHE GESTANTE PAR L'HPSM, L'HORMONE DE CROISSANCE ET LA PROLACTINE.



Conditions: - 100 μ l d'HPSM radiomarquée correspondant à \approx 15.000 cpm.

- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à \approx 1,5 mg de protéines.

Caractéristiques: NSB = 520 cpm \approx 3,5 %; Bo/T \approx 11 %.

En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

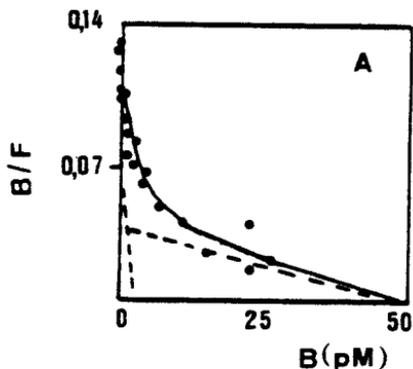
En ordonnée: (échelle arithmétique) B/Bo x 100.

• = HPSM

▲ = hormone de croissance bGH-NIH-B18

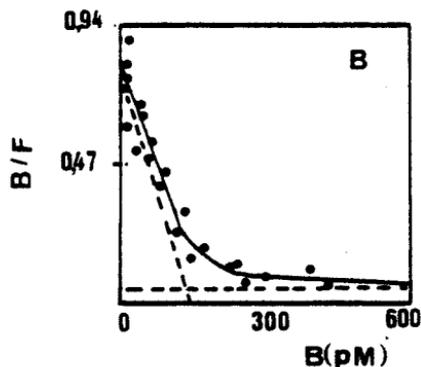
* = prolactine bPRL-NIH-B4

Fig.29 - LIAISON DE L'HPSM, DE LA PROLACTINE ET DE L'HORMONE DE CROISSANCE AUX RÉCEPTEURS MAMMAIRES DE VACHE GESTANTE: REPRÉSENTATION GRAPHIQUE, SELON SCATCHARD, DES CONCENTRATIONS À L'ÉQUILIBRE.

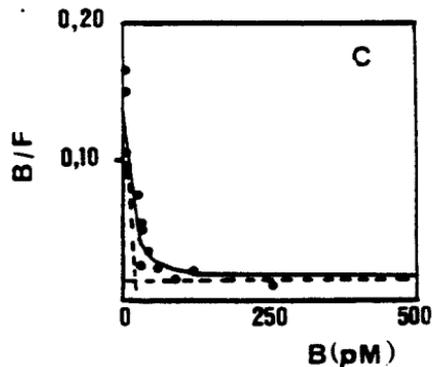


LIAISON DE L'HPSM AUX RECEPTES MAMMAIRES.

Le graphique de Scatchard révèle la présence de deux populations de récepteurs.



LIAISON DE LA PROLACTINE AUX RECEPTES MAMMAIRES DE LA VACHE



LIAISON DE L'HORMONE DE CROISSANCE AUX RECEPTES MAMMAIRES DE LA VACHE.

de sites récepteurs et permet de les caractériser. Les constantes d'association à l'équilibre sont de $3,7 \times 10^{10} M^{-1}$ (1^e population) et de $1,0 \times 10^9 M^{-1}$ (2^e population). Le nombre de sites de liaison est respectivement de 0,68 fmoles/mg de protéines (1^e population) et de 15,60 fmoles/mg de protéines (2^e population).

Ces résultats nous ont amenés à mettre la suspension de récepteurs mammaires de vache en présence de prolactine et d'hormone de croissance radioactives (tableau 11).

La liaison de la prolactine radiomarquée est inhibée par la prolactine *froide* et par l'HPSM (Fig.30). L'hormone de croissance n'interfère que par sa contamination en prolactine (confer 1.2.4.2. ,page 45).

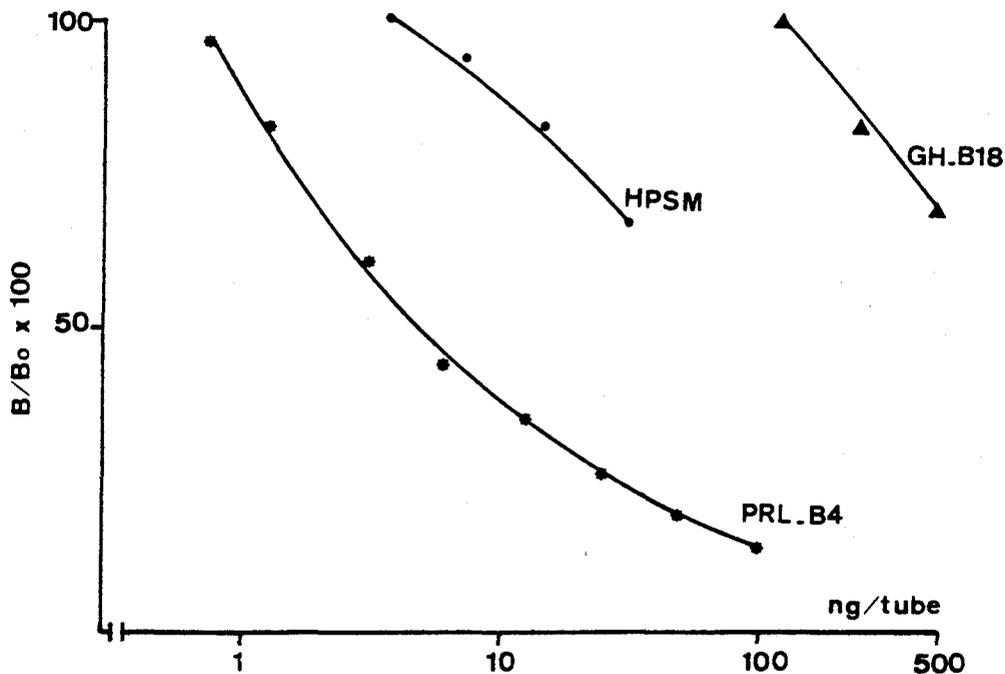
La liaison de l'hormone de croissance radiomarquée est inhibée par l'hormone de croissance *froide* et par l'HPSM (Fig.31). La prolactine n'interfère pas dans la liaison.

La caractérisation de la liaison des hormones aux récepteurs a été réalisée selon la méthode graphique de Scatchard - à partir des concentrations d'hormone libre et liée mesurées à l'équilibre - sur la base de la courbe d'inhibition.

La liaison de la prolactine (bPRL-NIH-84), aux sites récepteurs de la glande mammaire bovine, se caractérise par une constante d'association à l'équilibre de $5,4 \times 10^9 M^{-1}$ et par un nombre de sites de liaison de 46,5 fmoles/mg de protéines (Fig.29 B, page 141).

La liaison de l'hormone de croissance (bGH-NIH-818) aux sites récepteurs de la glande mammaire bovine, se caractérise par une constante d'association à l'équilibre de $6,0 \times 10^9 M^{-1}$ et un nombre de sites de liaison de 9,3 fmoles/mg de protéines (Fig.29 C,page 141).

Fig. 30 - INHIBITION DE LA LIAISON DE LA PROLACTINE RADIOACTIVE AUX SITES RÉCEPTEURS MAMMAIRES DE VACHE GESTANTE PAR LA PROLACTINE, L'HPSM ET L'HORMONE DE CROISSANCE.



Conditions: - 100 μ l de prolactine radiomarquée correspondant à \approx 15.000 cpm;
- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à \approx 1,5 mg de protéines.

Caractéristiques: NSB = 480 cpm \approx 3 %; Bo/T \approx 16 %.

En abscisse: (échelle logarithmique). Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

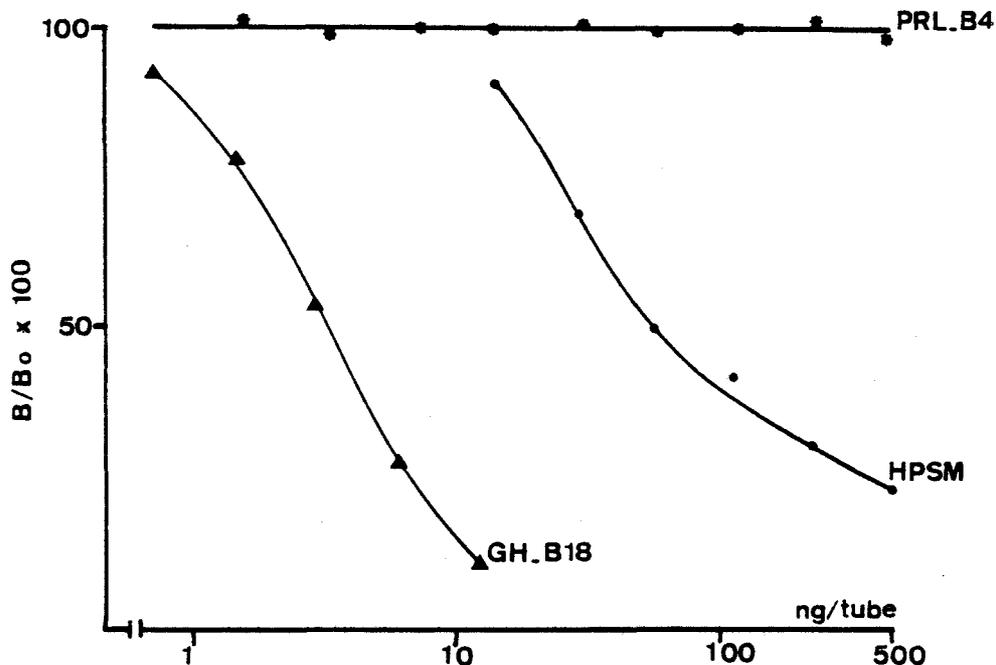
En ordonnée: (échelle arithmétique) B/Bo x 100.

● = prolactine bPRL-NIH-B4

• = HPSM

▲ = hormone de croissance bGH-NIH-B18

Fig.31 - INHIBITION DE LA LIAISON DE L'HORMONE DE CROISSANCE RADIOMARQUÉE AUX SITES RÉCEPTEURS MAMMAIRES DE VACHE GESTANTE PAR L'HORMONE DE CROISSANCE, L'HPSM ET LA PROLACTINE.



Conditions: - 100 μ l d'hormone de croissance radiomarquée correspondant à \approx 15.000 cpm;
- 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à \approx 1,5 mg de protéines.

Caractéristiques: NSB = 675 cpm \approx 4,5 %; $B_0/T \approx$ 7 %.

En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (ng/tube).

En ordonnée: (échelle arithmétique) $B/B_0 \times 100$.

▲ = hormone de croissance bGH-NIH-B18

• = HPSM

•* = prolactine bPRL-NIH-B4

5.4. DISCUSSION

L'incubation d'une préparation d'HPSM ^{125}I avec des suspensions membranaires de différents tissus, nous a permis de mettre en évidence chez la vache, des sites de fixation de deux types:

- un type somatotrope retrouvé au niveau du foie, du corps jaune, de l'endomètre, du tissu adipeux et de la glande mammaire;
- un type prolactinique uniquement retrouvé au niveau de la glande mammaire.

La liaison des hormones hypophysaires apparentées (prolactine et hormone de croissance) et les courbes d'inhibition produites par ces dernières ,confirment cette observation.

La présence de sites récepteurs de type somatotrope au niveau du foie, du corps jaune, de l'endomètre, du tissu adipeux et de la glande mammaire permet de postuler l'existence d'une activité de l'hormone de croissance et de l'HPSM sur ces organes. L'affinité de ces récepteurs est compatible avec les concentrations plasmatiques de ces hormones; cependant, le nombre de sites de liaison est relativement faible(tableau 12).

Au niveau de la glande mammaire bovine, nous avons observé que la liaison de l'HPSM ^{125}I est inhibée par la prolactine et par l'hormone de croissance; de plus, l'HPSM paraît se lier à deux populations de sites d'affinités différentes.

La coexistence, de récepteurs membranaires de types somatotrope et prolactinique, au niveau de la glande mammaire bovine, s'est vue confirmée, par l'étude de la liaison de la prolactine et de l'hormone somatotrope. Le tableau 13 permet de comparer l'affinité de l'HPSM, de la prolactine et de

Tableau 12 - CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE L'HPSM AUX RÉCEPTEURS CHEZ LA VACHE

Homogénats tissulaires de	Type de compétition	Radioactivité spécifique ($\mu\text{Ci}/\text{pmole}$)	K_a (M^{-1})	Nbre de sites (fmoles/mg)
Foie	inhibition	7,50	$6,7 \times 10^9$	8,5
Endomètre	inhibition	7,50	$9,3 \times 10^9$	13,3
Corps jaune	inhibition	7,50	$8,4 \times 10^9$	3,1
Mamelle	inhibition	7,50	$3,7 \times 10^{10*}$	$0,7^*$
			$1,0 \times 10^9^{**}$	$15,6^{**}$

Tableau 13 - COMPARAISON DE LA LIAISON DE L'HPSM, DE LA PROLACTINE ET DE L'HORMONE DE CROISSANCE AUX RÉCEPTEURS MAMMAIRES.

Hormones	Type de compétition	Radioactivité spécifique ($\mu\text{Ci}/\text{pmole}$)	K_a (M^{-1})	Nbre de sites (fmoles/mg)
HPSM	inhibition	7,50	$3,7 \times 10^{10*}$	$0,7^*$
			$1,0 \times 10^9^{**}$	$15,6^{**}$
Prolactine	inhibition	0,36	$5,4 \times 10^9$	46,5
Hormone de croissance	inhibition	0,35	$6,0 \times 10^9$	9,3

* 1^e population de sites récepteurs** 2^e population de sites récepteurs

l'hormone de croissance pour les sites de liaison observés au niveau de ces tissus. Ces résultats sont en accord avec les courbes d'inhibition observées dans les Fig.28,30 et 31. L'HPSM se lie à deux populations de sites de fixation, d'affinité différente. Il est très vraisemblable qu'il s'agisse des populations de sites de type somatotrope et de type prolactinique. Cette suggestion est compatible avec l'attribution à l'hormone de croissance d'un rôle important au niveau de la mamelle chez la vache. (Cowie et coll.,1980). Cependant, il n'est pas possible d'établir une relation d'identité entre les constantes d'association à l'équilibre et les nombres de sites de fixation; par rapport à la prolactine et à l'hormone de croissance (tableau 13), l'HPSM se lie en effet avec une affinité plus grande mais à un nombre de sites plus faible que les hormones hypophysaires apparentées. Cette observation doit être mise en relation avec les résultats de l'étude des récepteurs de lapine gestante, elle pourrait s'expliquer par la structure particulière de l'HPSM qui lui confère une activité à la fois bifonctionnelle et très élevée.

6. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HPSM,

6.1. INTRODUCTION,

Le dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires convient parfaitement pour mesurer l'activité hormonale de l'HPSM au cours des différentes phases de la purification. Il ne permet cependant pas la détermination exacte des concentrations en HPSM des différents liquides biologiques, du fait de l'interférence de la prolactine, de l'hormone de croissance et des protéines sériques.

La mise au point d'un dosage radioimmunologique devait permettre de pallier cette déficience, du dosage par liaison aux récepteurs, en fournissant une méthode particulièrement spécifique et sensible.

6.2. MATERIELS ET METHODES

6.2.1. ANTISÉRUMS

6.2.1.1. PRODUCTION

Douze lapins et six cobayes furent immunisés au moyen d'une préparation d'HPSM hautement purifiée. Les injections étaient pratiquées par voie intradermique

selon la méthode de Vaitukaitis et coll. (1971).

Les lapins ont reçu, par séance, 100 ou 200 µg d'hormone purifiée diluée dans 1 ml de tampon phosphate sodico-potassique 0,05 M ajusté à pH 7,5 ; chlorure de sodium 0,15 M. L'adjuvant complet de Freund était ajouté à raison de 0,5 à 1 ml par lapin.

Les cobayes ont reçu, par séance, 100 µg d'hormone purifiée, diluée dans 0,25 ml de tampon et additionnée de 0,25 ml d'adjuvant incomplet de Freund.

Les immunisations ont été répétées tous les 15 à 20 jours pendant au moins 5 mois.

Des saignées mensuelles de 50 à 75 ml chez le lapin et de 1 à 5 ml chez le cobaye furent réalisées à la veine de l'oreille à partir du 3^e mois suivant la première immunisation.

6.2.1.2. CARACTERISATION

- Antisérums obtenus par l'immunisation de cobayes

Les 6 cobayes (3 mâles, 3 femelles) immunisés au moyen de l'hormone purifiée ont tous survécu aux injections. Il est intéressant de signaler que durant la période d'immunisation, les 3 femelles ont mené à bien une gestation et ont élevé leurs petits sans aucun problème.

Les antisérums obtenus présentent les titres suivants : 1/5.000 ; 1/20.000 ; 1/40.000 ; 1/80.000 ; 1/150.000 et 1/200.000.

La sensibilité des courbes d'inhibition obtenues avec ces antisérums est restée constamment inférieure à celle obtenue avec les antisérums produits sur lapin.

- Antisérums obtenus par l'immunisation de lapins.

Les 12 lapins immunisés ont fourni des antisérums pouvant être utilisés aux dilutions finales suivantes: 1/30.000; 1/40.000; 1/50.000; 1/60.000; 1/80.000; 1/90.000; 1/100.000; 1/150.000; 1/300.000; 1/400.000; 1/500.000 et 1/600.000.

6.2.2. HORMONE RADIOMARQUÉE

6.2.2.1. PRODUCTION

Le marquage de l'HPSM à l'iode ^{125}I suivant la méthode à la lactoperoxydase de Thorell et Johansson (1971) est réalisé dans la proportion de 2,5 μg d'hormone pour 1 milliCurie. La méthode de marquage a été décrite au paragraphe 1.2.1.1., page 34.

6.2.2.2. CARACTERISATION

La liaison spécifique de l'HPSM ^{125}I - à l'antisérum présent en excès dans le milieu - est de 95 % lorsque l'expérience est réalisée le jour du marquage. Après une dizaine de jours de stockage à -20°C , cette capacité maximale de liaison de l'hormone radiomarquée chute à 75 %.

La liaison non spécifique (NSB) est généralement faible, dans les conditions normales de dosage, elle reste inférieure à 2 % de la radioactivité introduite dans le milieu.

Déterminée suivant la méthode d'"auto-inhibition", la radioactivité spécifique de l'HPSM ^{125}I est de 460.000 cpm/ng, soit 376,7 Ci/g ou 12,4 $\mu\text{Ci}/\text{pmole}$. Cette valeur est proche de celle déterminée dans les dosages, par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires de lapines gestantes,

pourvu que la comparaison tienne compte de la " fraction intacte " de l'hormone radiomarquée, établie dans l'un et l'autre système.

6.2.3. SÉPARATION DES FRACTIONS LIBRE ET LIÉE.

Au cours du dosage, les fractions libre et liée sont séparées par l'addition d'un second antisérum (anti-immunoglobulines) couplé à de la cellulose.

L'antisérum antiimmunoglobulines de lapin est produit chez le mouton tandis que l'antisérum antiimmunoglobulines de cobaye est préparé chez le lapin. Tous les animaux sont immunisés au moyen d'immunoglobulines purifiées selon la méthode de Harboe et Ingild (1973). Les immunoglobulines sont précipitées à partir de l'antisérum par le sulfate de soude, selon la méthode de Kekwick (1940), puis couplées à de la cellulose microcristalline activée au bromure de cyanogène selon la technique d'Axen et coll. (1967).

6.2.4. DOSAGE

Les conditions du dosage sont les suivantes:

- le dosage est réalisé dans des tubes de cristal de polystyrène de dimensions 13 x 70 mm;
- un tampon Tris-HCl 0,025 M; $MgCl_2$ 0,010 M; pH 7,6; 0,1 % BSA (fraction V de Cohn) 0,01 % de sulfate de néomycine est utilisé pour toutes les dilutions;
- l'échantillon à doser (standard de référence, sérum ou extrait de placenta) est additionné à raison de 100 ou 200 μ l;
- la quantité d'hormone radiomarquée ajoutée au milieu équivaut à \approx 15.000 cpm;
- l'antisérum 286 est utilisé à la dilution finale de 1/300.000;
- le volume d'incubation est de 500 μ l;

- l'antisérum antiimmunoglobulines de lapin couplé à de la cellulose est additionné à raison de 1 ml de suspension correspondant à \approx 2 mg de cellulose.

Pour augmenter la sensibilité du dosage, nous avons recherché les conditions les plus favorables en ajoutant les réactifs successivement et en faisant varier les conditions d'incubation:

Méthode a.

- 100 μ l de sérum;
- addition simultanée de l'antisérum et de l'hormone radio-marquée (\approx 15.000 cpm/tube);
- incubation de 16 à 24 heures à 4°C;
- addition de la cellulose antiimmunoglobulines;
- 2^e incubation de 16 heures à 4°C;
- centrifugation et aspiration du liquide surnageant;
- lavage du culot;
- comptage de la radioactivité.

Méthode b.

- 100 μ l de sérum;
- addition de l'antisérum
- préincubation de 16 heures à 4°C;
- addition de l'hormone radiomarquée (\approx 15.000 cpm/tube);
- incubation de 8 heures à 4°C;
- addition de la cellulose antiimmunoglobulines;
- 2^e incubation de 16 heures à 4°C;
- centrifugation et aspiration du liquide surnageant;
- lavage du culot;
- comptage de la radioactivité.

Méthode c.

- 500 μ l de sérum;
- addition de 100 μ l d'antisérum 5 fois plus concentré, soit 1/12.500;

- préincubation de 16 heures à 4°C;
- dilution pour amener le volume d'incubation à 2 ml;
- reprise de 400 µl de chaque tube puis addition de 100 µl d'HPSM radiomarquée (≈ 15.000 cpm/tube);
- incubation de 8 heures à 4°C;
- addition de la cellulose antiimmunoglobulines;
- 2^e incubation de 16 heures à 4°C;
- centrifugation et aspiration du liquide surnageant;
- lavage du culot;
- comptage de la radioactivité.

6.2.5. EXTRACTION DE L'HPSM NATIVE.

Les extraits cotylédonnaires d'HPSM native sont préparés en prenant soin d'éviter toute dénaturation de l'hormone. Dans ce but, l'extraction est réalisée de la manière suivante:

- les cotylédons foetaux et maternels sont broyés, pendant environ une minute et extraits en tampon glycine 0,05 M ajusté à pH 7,5 par de l'hydroxyde de sodium et additionné de chlorure de sodium 9g/litre;
- l'extraction est poursuivie pendant une heure à la température de 4°C puis la solution est clarifiée par centrifugation à 13.000 g pendant 40 minutes à 4°C.

6.3. RESULTATS

6.3.1. SENSIBILITÉ

Les courbes d'inhibition ou courbes standards du dosage radioimmunologique de l'HPSM, réalisé suivant

les 3 méthodes décrites ci-dessus, sont représentées à la Fig. 32.

La méthode c. s'est révélée la plus sensible (≈ 5 pg/tube) elle a, de ce fait été retenue pour la plupart de nos dosages ultérieurs.

6.3.2. SPÉCIFICITÉ,

La spécificité du dosage radioimmunologique de l'HPSM est parfaite vis-à-vis de la prolactine et de l'hormone de croissance; la présence de 10 μ g et même de 20 μ g de ces hormones, ne produit absolument aucune inhibition de la liaison de l'HPSM radioactive, aux anticorps (Fig.33).

Aucune liaison n'est observée lorsque l'antisérum, non dilué, est mis en présence de prolactine ou d'hormone de croissance radiomarquées. Les anticorps dirigés contre l'HPSM ne reconnaissent donc ni la prolactine ni l'hormone de croissance.

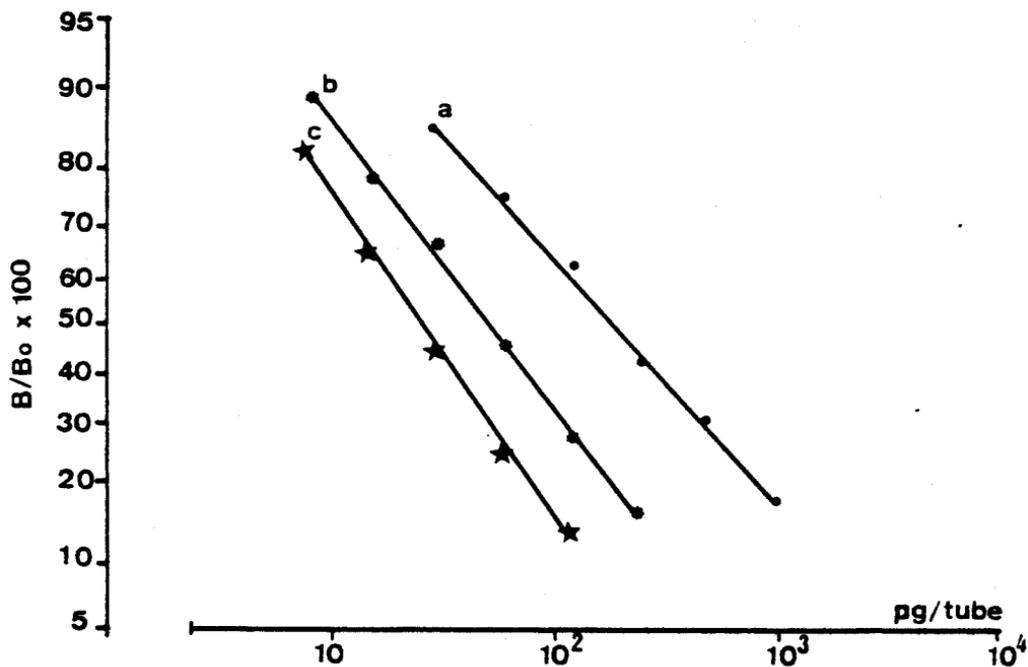
6.3.3. COMPARAISON DES CONCENTRATIONS DÉTERMINÉES PAR DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE ET PAR LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES,

La détermination des concentrations en HPSM par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires hépatiques ou mammaires est applicable aux extraits cotylédonnaires, car ceux-ci sont riches en hormone. Il est dès lors possible de comparer les valeurs obtenues par cette méthode à celles déterminées par la méthode radioimmunologique.

Les résultats, exprimés en mg d'HPSM par kg de tissu, sont repris dans le tableau 14.

Ainsi donc, et cela ne manque pas d'intérêt, les trois systèmes de dosage se comportent de manière équivalente en présence de l'HPSM native présente dans les cotylédons.

Fig.32 - DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HPSM: COURBES D'INHIBITION OU COURBES " STANDARDS" EN FONCTION DE LA MÉTHODE UTILISÉE.



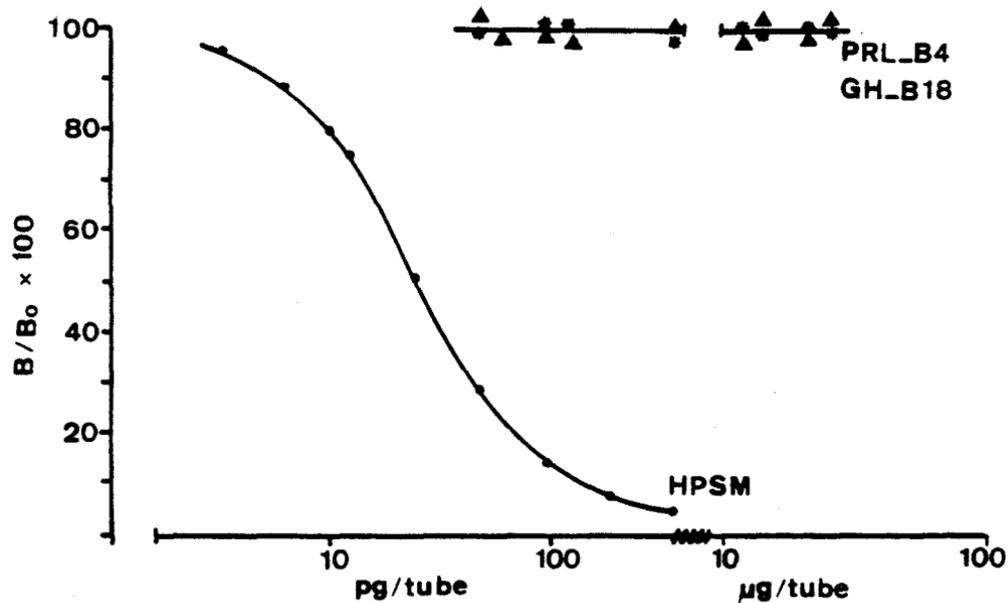
Conditions: Dosages réalisés suivant les méthodes a,b et c.

En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'HPSM froide, additionnée au milieu(pg/tube).

En ordonnée: (échelle logit) $B/B_0 \times 100$.

Méthode	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 %	Quantité minimale détectable
a = ●	$-0,86 \pm 0,29$	$186,10 \pm 5,27$	9,52
b = •	$-1,06 \pm 0,05$	$48,10 \pm 1,27$	6,40
c = ★	$-1,46 \pm 0,06$	$27,00 \pm 0,65$	5,06

Fig. 33 - SPÉCIFICITÉ DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HPSM



Conditions: méthode c.

En abscisse: (échelle logarithmique) Quantité d'hormone froide, additionnée au milieu (pg ou $\mu\text{g}/\text{tube}$).

En ordonnée: (échelle arithmétique) $B/B_0 \times 100$.

- = HPSM
- ▲ = hormone de croissance bGH-NIH-B18
- ◼ = prolactine bPRL-NIH-B4

Tableau 14 - COMPARAISON DES TENEURS* DÉTERMINÉES PAR LA MÉTHODE RADIOIMMUNOLOGIQUE ET CELLES MESURÉES PAR LIAISON RADIOCOMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DE LAPINE GESTANTE.

Cotylédons	Dosage par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires :		Dosage radioimmunologique
foetaux	hépatiques	mammaires	
1**	32,2	37,5	33,7
2**	23,2	21,0	23,7
3**	11,5	14,2	13,0
4**	39,0	39,2	41,0
5**	12,5	14,1	17,0

maternels			
6**	7,5	7,0	7,8
7**	5,1	4,8	4,5
8**	4,5	3,9	4,5
9**	8,0	6,7	9,0
10**	8,8	8,7	12,0

* Les teneurs sont exprimées en mg d'HPSM par kg de tissu frais.

** L'analyse de variance ne révèle aucune différence significative entre les concentrations mesurées suivant les trois méthodes de dosage.

6.4. DISCUSSION

L'immunisation de lapins au moyen d'une préparation d'HPSM hautement purifiée nous a fourni des anti-sérums permettant la mise au point d'un dosage radioimmunologique spécifique et sensible.

Aucune réaction croisée n'est observée ni avec l'hormone de croissance ni avec la prolactine bovine, même lorsque les antisérums anti-HPSM sont incubés en présence de prolactine ou d'hormone de croissance marquées à l'iode 125 .

Cette caractéristique rapproche l'HPSM de l'oPL (oCS) qui, non plus, ne présente aucune parenté immunologique avec les hormones hypophysaires ovines (Martal, 1980).

L'hPL pourtant, présente une parenté immunologique avec l'hGH. Cette caractéristique de l'hPL a notamment permis à Josimovich et MacLaren de mettre l'hormone en évidence au cours de l'isolement. (Josimovich et MacLaren, 1962).

La sensibilité du dosage radioimmunologique de l'HPSM est remarquable. Elle est influencée par la qualité des différents réactifs mis en présence:

- la préparation d'HPSM est très pure et très active;
- l'antisérum présente une grande affinité pour l'hormone;
- la préparation d'HPSM 125 I possède une radioactivité spécifique élevée, respectant néanmoins l'intégrité de la plus grande partie des molécules radioactives.

De surcroît, l'irréversibilité, du moins partielle, de la réaction antigène-anticorps (hormone-antisérum) permet d'augmenter la sensibilité et la précision de la méthode, par

une préincubation de l'hormone *froide* avec l'antisérum.

Cet effet est encore accru lorsque ces réactifs sont préincubés à une concentration de 5 à 10 fois plus élevée que celle d'équilibre. Cette modification de la méthode n'allonge pour ainsi dire pas la durée du dosage.

Disposant d'un système de dosage radioimmunologique très spécifique et très sensible, nous pouvons envisager la détermination des concentrations d'HPSM des différents liquides biologiques, dans des conditions favorables.

7. APPLICATIONS DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HPSM

7.1. INTRODUCTION

L'établissement des concentrations en HPSM des cotylédons maternels et foetaux, des liquides amniotiques et allantoïdiens, du sérum foetal et maternel suscitait notre curiosité car les résultats de Bolander et coll. (1976), Bolander et Fellows (1976) nous paraissaient contestables.

La présence de concentrations élevées de prolactine dans le liquide amniotique (Tyson et coll., 1972; Fang et Kim, 1975; Chochinov et coll., 1976) et, la description d'une sécrétion de prolactine, par le tissu chorionique humain (Golander et coll., 1978), justifiaient la détermination des concentrations de prolactine dans les liquides amniotique et allantoïdien chez la vache.

Enfin, nous avons complété notre étude, par le dosage de la prolactine et de l'hormone somatotrope, dans le sérum foetal. Les concentrations en ces hormones hypophysaires, pourront être comparées à celles en hormone placentaire bifonctionnelle, somato-mammotrope.

de néomycine, dans les mêmes conditions que celui de l'HPSM.

Caractéristique du dosage

La spécificité du dosage est excellente, aucune réaction croisée n'est détectée avec les autres hormones hypophysaires ni avec l'HPSM. L'hormone de croissance (bGH-NIH-B18) présente une interférence d'environ 1,0 %, calculée à 50 % d'inhibition de la liaison en absence d'hormone " froide ". Cette interférence résulte, selon toute vraisemblance, de la contamination en prolactine, de cette préparation d'hormone de croissance (confer 1.2.4.2., page 45).

La sensibilité du dosage est de 30 pg par tube dans les conditions normales de dosage, soit 0,3 ng/ml dans le sérum.

7.2.3. MISE AU POINT D'UN DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HORMONE DE CROISSANCE.

Production d'un antisérum

Deux lapins sont immunisés, tous les 15-20 jours au moyen de 50 µg d'hormone de croissance bovine (bGH-NIH-B18) dilués dans 0,5 ml de NaCl 9‰, et additionnés de 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund. Les lapins sont saignés quatre mois après la première immunisation. Le titre des antisérums s'est révélé relativement faible.

Marquage de l'hormone de croissance à l'iode 125

Ce dernier est réalisé de la même manière que pour les dosages par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires. (confer 1.2.1.1., pages 34 et 35).

Conditions du dosage

Le dosage est réalisé en tampon Tris-HCl 0,025 M; $MgCl_2$ 0,01 M; pH 7,6 ; 0,1 % BSA; 0,01 % de sulfate de néomycine , de la manière suivante:

- 100 μ l de sérum ou de standard de référence;
- 200 μ l de tampon;
- 100 μ l d'antisérum à la dilution de 1/2.500;
- préincubation de 16 heures à 4°C;
- 100 μ l d'hormone radiomarquée (\approx 15.000 cpm);
- incubation de 8 heures à 4°C;
- 500 μ l de cellulose antiimmunoglobulines de lapin;
- 2^e incubation de 16 heures à 4°C;
- centrifugation, lavage du culot et comptage de la radio-activité.

Caractéristique du dosage

Le dosage s'est révélé parfaitement spécifique vis-à-vis de la prolactine et de l'HPSM.

La sensibilité est relativement faible soit 2,5 ng d'hormone par ml de sérum.

7.2.4. PRÉLÈVEMENT DES COTYLÉDONS FOETAUX ET MATERNELS; EXTRACTION DE L'HORMONE.

Les placentas ont été recueillis à l'abattoir; une dissection minutieuse permet de séparer les cotylédons foetaux et maternels.

Ces tissus ont été extraits en tampon glycine 0,05 M, ajusté à pH 7,5 par de l'hydroxyde de sodium et , additionné de chlorure de sodium 9 g par litre. Il a été procédé de la manière décrite antérieurement (confer 4.2.3., page 100).

7.2.5. COLLECTE DES LIQUIDES FOETAUX

Les foetus sont recueillis à l'abattoir environ 15 à 30 minutes après l'abattage de la mère. L'âge est déterminé approximativement, le liquide amniotique, et le liquide allantoïdien sont collectés séparément. Enfin, le sang du foetus est recueilli par ponction cardiaque.

7.2.6. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SANG DE VACHES GESTANTES

Un prélèvement de sang est effectué tous les 10 à 15 jours chez onze vaches, dont nous avons noté précisément le moment d'insémination et de parturition.

Le sang, recueilli en présence d'héparine, est centrifugé dans l'heure suivante. Le plasma est conservé à -20°C.

Parallèlement et pour servir de témoins, une centaine de prélèvements ont été réalisés chez des taureaux et des vaches non gestantes.

7.3. RESULTATS

7.3.1. CONCENTRATION EN HPSM DES COTYLÉDONS MATERNELS ET FOETAUX.

La concentration en HPSM des cotylédons foetaux est en moyenne 3 à 4 fois supérieure à celle des cotylédons maternels. Les résultats sont repris dans le tableau 15.

Tableau 15 - COMPARAISON DES CONCENTRATIONS EN HPSM, DANS LES COTYLÉDONS FOETAUX ET MATERNELS: LES TENEURS SONT EXPRIMÉES EN MG D'HORMONE PAR KG DE TISSU FRAIS.

Vache	Cotylédons foetaux	Cotylédons maternels
n° 1	41,0	12,0
n° 2	33,7	9,0
n° 3	23,7	7,8
n° 4	17,0	4,5
n° 5	13,0	4,5
Moyennes	25,7	7,6

7.3.2. CONCENTRATION DES LIQUIDES AMNIOTIQUES ET ALLANTOÏDIENS EN HPSM ET EN PROLACTINE

Les concentrations des liquides amniotiques et allantoïdiens en HPSM et en prolactine sont reprises dans le tableau 16.

Les concentrations en prolactine sont en moyenne très faibles, plusieurs valeurs se situent en-dessous de la sensibilité de la méthode (0,3 ng/ml).

En ce qui concerne l'HPSM, les concentrations des liquides allantoïdiens sont en moyenne environ 11 fois supérieures à celles des liquides amniotiques.

Tableau 16 - CONCENTRATION DES LIQUIDES AMNIOTIQUES ET ALLANTOÏDIENS EN HPSM ET EN PROLACTINE.

Moment de la gestation (mois)	Liquides amniotiques (ng/ml)		Liquides allantoïdiens (ng/ml)	
	HPSM	PRL	HPSM	PRL
2 à 3	1,5	< 0,3	17,0	< 0,3
2 à 3	1,8	-	80,0	0,3
3	9,6	-	38,0	0,3
3	1,0	< 0,3	5,4	< 0,3
3	1,2	-	250,0	0,4
3 à 4	9,0	< 0,3	20,0	0,4
3 à 4	8,0	-	45,0	0,3
3 à 4	-	-	16,5	-
4 à 5	5,6	< 0,3	2,8	0,8
6	2,4	< 0,3	2,1	6,0
7	0,3	0,4	6,6	1,3

7.3.3. CONCENTRATION DU SÉRUM FOETAL EN HPSM, EN PROLACTINE ET EN HORMONE DE CROISSANCE.

La Fig.34 permet de situer les concentrations de l'HPSM dans le sang de foetus, d'âges différents. Elevée, au début de la vie foetale (2,5 à 3 mois) la teneur en HPSM diminue jusqu'au moment de la naissance.

Ainsi qu'il apparaît dans la Fig.35, les teneurs du sérum foetal en hormone de croissance varient considérablement d'un individu à l'autre.

La prolactine n'apparaît dans le sérum foetal qu'au delà du 4^e mois, son taux augmente régulièrement jusqu'au moment de la naissance (Fig.36).

7.3.4. CONCENTRATION SÉRIQUE DE L'HPSM CHEZ LA VACHE GESTANTE

Au cours de la gestation, l'HPSM apparaît dans le sérum maternel au plus tôt à partir du 26^e jour, au plus tard à partir du 110^e jour après la fécondation (Fig.37)

Sa concentration s'élève graduellement en fonction de l'avancement de la gestation. Il existe des différences individuelles très importantes. Les concentrations maximales semblent cependant atteintes en fin de gestation.

7.4. DISCUSSION

La concentration des cotylédons foetaux en HPSM (\approx 26 mg/kg de tissu frais) est en moyenne 3 à 4 fois plus élevée que celle des cotylédons maternels (8 mg/kg de tissu frais). Cette observation concorde avec l'origine

Fig.34 - CONCENTRATION DE L'HPSM DANS LE SÉRUM FOETAL EN FONCTION DE L'ÂGE.

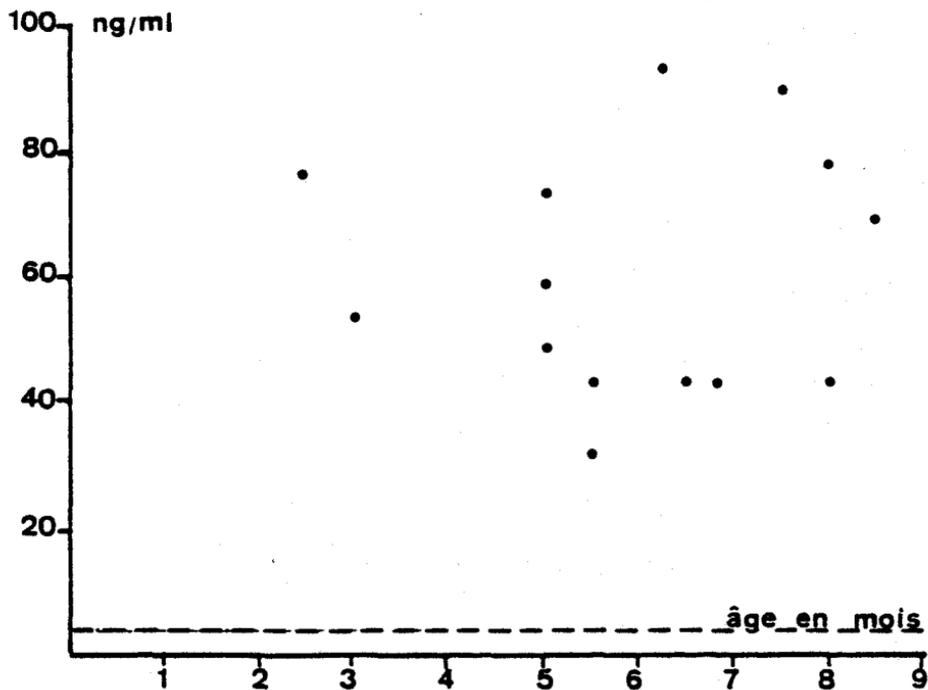


En abscisse: âge approximatif exprimé en mois.

En ordonnée: concentration d'HPSM (ng/ml)

— limite de sensibilité de la méthode.

Fig. 35 - CONCENTRATION DE L'HORMONE SOMATOTROPE DANS LE SÉRUM FOETAL EN FONCTION DE L'ÂGE.

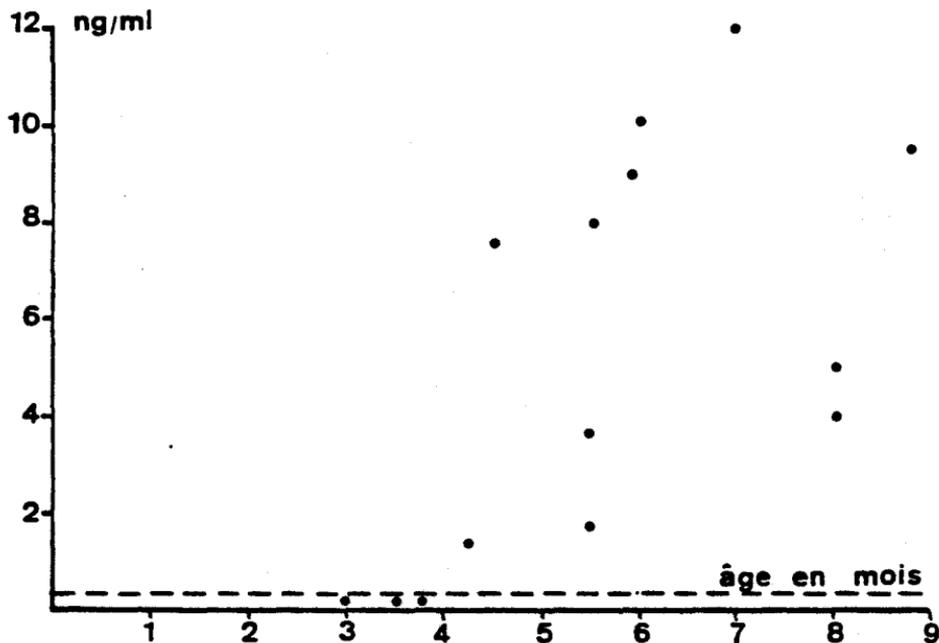


En abscisse: âge approximatif exprimé en mois.

En ordonnée: concentration d'hormone somatotrope (ng/ml)

--- limite de sensibilité de la méthode.

Fig. 36 - CONCENTRATION DE LA PROLACTINE DANS LE SÉRUM FOETAL EN FONCTION DE L'ÂGE.

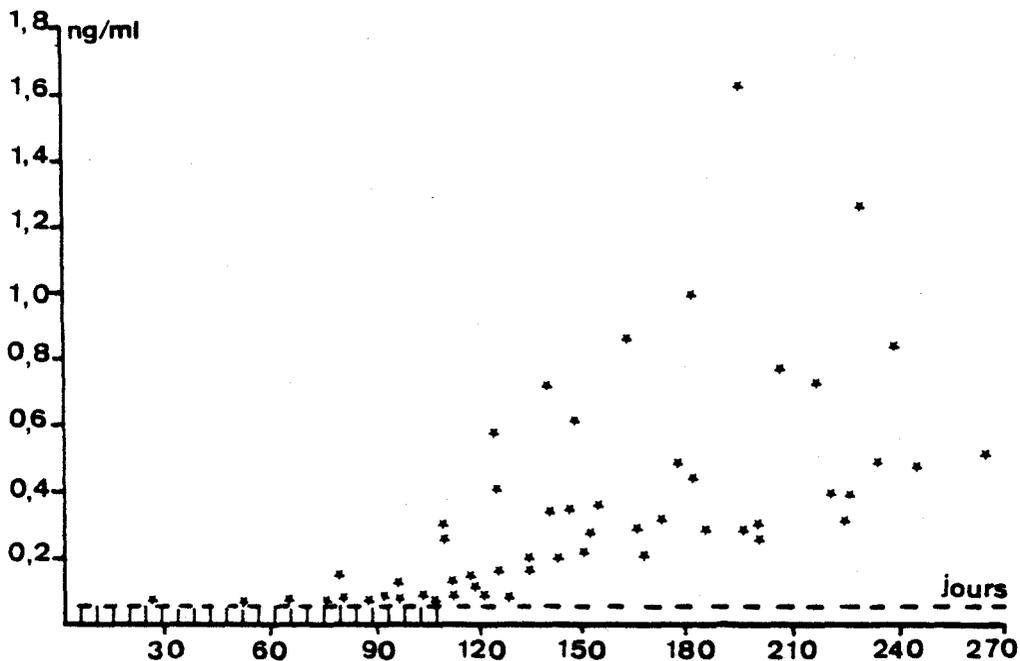


En abscisse: âge approximatif exprimé en mois

En ordonnée: concentration de prolactine (ng/ml)

— limite de sensibilité de la méthode.

Fig. 37 - TENEURS DES SÉRUMS MATERNELS EN HPSM EN FONCTION DU MOMENT DE LA GESTATION.



En abscisse: moment de la gestation exprimé en jours

En ordonnée: concentration de l'HPSM (ng/ml)

— limite de sensibilité de la méthode

|||| présence de sérums dans lesquels l'HPSM est indosable.

placentaire de l'hormone. Selon toute vraisemblance, comme l'oPL, l'HPSM est sécrétée par les cellules binucléées qui apparaissent dans l'épithélium chorionique (Martal, 1980) La migration d'une partie de ces cellules dans l'épithélium utérin pourrait expliquer la présence de l'HPSM dans les cotylédons utérins et dans le sang maternel.

La concentration de l'HPSM , dans le sérum du foetus, est relativement élevée au début de la vie foetale (20 à 30 ng/ml). Elle diminue ensuite pour se situer aux environs de 5 ng/ml durant le dernier mois de la gestation.

Dans le liquide amniotique, les variations individuelles de l'HPSM sont importantes, cependant, les concentrations sont du même ordre de grandeur que celles du sérum foetal. Cette constatation pourrait s'expliquer, du fait que le foetus baigne dans le liquide amniotique.

Dans le liquide allantoïdien, la concentration d'HPSM est nettement plus élevée, elle est probablement le résultat d'une concentration de l'hormone par excrétion rénale.

Dans le sérum maternel, la concentration en HPSM s'élève régulièrement durant la gestation pour atteindre 1 à 2 ng durant le dernier trimestre de celle-ci; l'hormone est détectable au plus tôt à partir du 26^e jour après la fécondation et au plus tard à partir du 110^e jour .

Sa concentration reste cependant toujours inférieure à celle du sérum foetal. Cette observation concorde avec la structure histologique du placenta de type épithélio-chorial. Dans ce dernier, le sang maternel est séparé du tissu trophoblastique par 3 couches cellulaires: l'endothélium du vaisseau, le tissu conjonctif et l'endothélium utérin.

Les très faibles teneurs en prolactine (indosable à 6 ng/ml), des liquides amniotiques et allantoïdiens, permettent d'exclure toute sécrétion de prolactine par le placenta chez la vache.

Ainsi, le rôle de la prolactine sur l'équilibre osmotique des liquides foetaux tel qu'il aurait été suspecté chez les primates (Josimovich,1977) ne semble pas se confirmer chez les bovins.

L'HPSM possédant une activité bifonctionnelle, il nous a paru intéressant de comparer les teneurs du sérum foetal en HPSM, en prolactine et en hormone de croissance.

Cette comparaison nous permet de déduire les constatations suivantes:

- l'hormone de croissance apparaît dès le 2^e mois, sa concentration reste élevée durant la vie foetale avec cependant des variations individuelles importantes. Des raisons matérielles nous ont empêchés d'entreprendre une étude plus précise sur l'apparition de la sécrétion de l'hormone de croissance chez le foetus bovin;
- la prolactine apparaît à partir du 4^e mois et sa concentration augmente jusqu'au moment de la naissance.

Les cellules somatotropes de l'hypophyse foetale entrent donc en activité beaucoup plus tôt que les cellules à prolactine.

D'origine placentaire, l'HPSM est présente chez les foetus les plus jeunes, sa concentration diminue en fonction de l'évolution de la gestation.

DISCUSSION GENERALE

Les études entreprises jusqu'à présent sur les fonctions du placenta bovin, sont beaucoup moins nombreuses que celles développées sur le placenta humain et ont accumulé beaucoup moins de connaissance de base. Ceci est vrai en particulier pour l'activité endocrine.

De plus, la structure histologique *épithélio-choriale* du placenta de la vache limite considérablement le passage des sécrétions chorioniques dans la circulation maternelle.

Enfin, la régulation hormonale des fonctions sexuelle et de reproduction de la vache s'effectue généralement à des concentrations hormonales beaucoup plus faibles que chez les primates. La très faible libération d'hormone par le placenta dans la circulation maternelle chez la vache explique pourquoi, encore à l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode *in vitro* spécifique permettant de poser ou de confirmer le diagnostic de la gravidité en son début.

L'intérêt considérable de l'endocrinologie placentaire chez la vache nous a incités à développer dans notre laboratoire des recherches dans ce domaine.

Nos études ont porté sur l'hormone somatomotrope dont l'existence avait été prouvée par différents auteurs mais au sujet de laquelle les informations restaient contradictoires.

Notre recherche a eu pour objectif:

- l'isolement de l'HPSM à partir du placenta et sa purification par diverses méthodes chromatographiques;
- la détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique de l'hormone;
- la mise au point du marquage de l'HPSM à l'iode 125 et l'étude de sa liaison aux récepteurs hépatiques et mammaires de lapine gestante;

- la mise en évidence de sites de liaison de type somatotrope et prolactinique au niveau de différents tissus, prélevés chez la vache gestante;
- la mise au point et la validation d'un dosage radioimmunologique spécifique et sensible;
- l'application du dosage radioimmunologique aux extraits de cotylédons trophoblastiques et utérins, aux liquides amniotiques et allantoïdiens, aux sérums foetaux et maternels.

Au terme de ce travail, nous avons précisé les conditions d'une méthode reproductible permettant d'isoler l'HPSM à partir des cotylédons foetaux recueillis dans des placentas provenant de vaches gestantes de 3 à 6 mois.

Purifiée environ 1.500 fois, notre préparation d'HPSM possède une activité bifonctionnelle élevée lorsqu'elle est testée par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires hépatiques et mammaires. Tant dans le dosage de la prolactine que dans celui de l'hormone de croissance, l'HPSM se comporte différemment des hormones hypophysaires de référence, en particulier, les courbes d'inhibition, représentées en logit, ne sont pas parallèles. Cette observation empêche de comparer quantitativement les activités spécifiques.

L'HPSM purifiée apparaît homogène à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Par comparaison à des protéines connues, son poids moléculaire se situe à 33.000 daltons environ.

Déterminé par focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide, son point isoélectrique est de 5,2.

Les caractéristiques de l'hormone, que nous avons purifiée, s'avèrent très différentes de celles du bPL

de Bolander et Fellows (1976). Ces auteurs en effet, ont isolé une préparation beaucoup moins active, d'un poids moléculaire de 21.150 daltons et d'un point isoélectrique de 5,9.

Par contre, nos résultats concordent beaucoup mieux avec ceux de Roy et coll.,(1971);Hayden et Forsyth,(1979); Bremel et coll.,(1980); Eakle et coll.,(1982) et enfin ceux de Murthy et coll.(1982). Les travaux de ces auteurs confirment la difficulté de mettre au point une méthode de purification de l'HPSM, aboutissant à une préparation biologiquement active, stable et de caractères physico-chimiques définis.

Sur la base du poids moléculaire, l'hormone placentaire somato-mammotrope bovine diffère nettement des hormones hypophysaires apparentées (prolactine et hormone de croissance). En effet, alors que l'hPL et l'oPL présentent un poids moléculaire - de 21.600 et 22.000 daltons, respectivement - très proche de celui des hormones hypophysaires, l'HPSM dont le poids moléculaire se situe à 33.000 daltons, se distingue nettement de la prolactine bovine (PM: 22.500) et de l'hormone de croissance bovine (PM: 21.600). Cette comparaison mériterait d'être poursuivie en déterminant sa composition en acides aminés et surtout en établissant sa structure primaire. De même, des études de structure tertiaire seraient particulièrement intéressantes pour élucider le processus d'interaction de l'hormone avec les récepteurs et, pour préciser le mécanisme de son activité bifonctionnelle, somatotrope et mammotrope. Il est clair cependant que des limitations en matériel nous ont empêchés de procéder à cette série d'études.

L'obtention d'une préparation d'HPSM radioactive de qualité, était une des conditions indispensables à la poursuite de nos travaux. Ainsi avons-nous mis au point le radiomarquage de l'HPSM pour aboutir à une préparation d'HPSM ^{125}I , douée d'une radioactivité spécifique très élevée. Nos études entreprises pour caractériser la liaison récepteurs-hormone montrent que, marquée à l'iode 125 , une partie de l'hormone radioactive conserve les mêmes propriétés de liaison que l'hormone *froide*, purifiée ou native.

Ces contrôles ont permis de démontrer que l'HPSM *froide* et l'HPSM radiomarkée se lient aux récepteurs avec la même affinité et à un nombre identique de sites.

Dans leur ensemble, ces recherches confirment l'activité bifonctionnelle de l'hormone placentaire somato-mammotrope bovine.

En effet, celle-ci est capable de se lier aux récepteurs hépatiques et mammaires de lapine gestante avec une grande affinité - supérieure à celle des hormones hypophysaires apparentées, la prolactine et l'hormone de croissance - .

Disposant d'une préparation d'HPSM radiomarkée douée d'une capacité de liaison intéressante, nous avons entrepris une étude sur la mise en évidence et la caractérisation des principaux sites de liaison, de types somatotrope et prolactinique, chez la vache. Mis à part les travaux de Moodbidri et coll. (1973) qui montrent une liaison de l'hPL aux homogénats tissulaires de corps jaune de buflonne, il n'existe, à notre connaissance, aucune autre étude comparable chez les bovins.

L'HPSM ^{125}I se lie spécifiquement aux homogénats tissulaires préparés à partir de la glande mammaire, du foie, du corps jaune, du tissu adipeux et de l'endomètre. A chacun de ces tissus, la liaison de l'HPSM se caractérise par une constante d'association à l'équilibre (K_a) élevée, compatible

avec les concentrations sériques de l'hormone chez la vache durant la seconde moitié de la gestation.

L'analyse de la liaison de l'HPSM au niveau de la glande mammaire de la vache gestante révèle l'existence de deux populations de sites de fixation, liant indépendamment la prolactine et l'hormone de croissance. Douée d'une activité bifonctionnelle, l'HPSM se lie aux deux populations de sites récepteurs avec une grande affinité.

Les sites de liaison de l'HPSM, mis en évidence dans le tissu hépatique, correspondent vraisemblablement à des récepteurs somatotropes. Ceci est en accord avec la localisation d'une sécrétion de somatomédines par le foie. En effet l'action de la somatotropine sur le cartilage de conjugaison, mais aussi probablement sur d'autres tissus passe par l'intermédiaire de ces dernières (Wallis, 1980).

Si nos expériences révèlent l'existence de sites de liaison de l'HPSM au niveau du corps jaune, elles montrent également que la fixation de l'hormone est inhibée par la somatotropine mais non par la lutropine ni par la prolactine.

Cette observation rend peu probable une action lutéotrope de l'HPSM et nous engage à ne pas considérer cette hormone comme porteuse du " signal embryonnaire " chez les bovins.

La liaison de l'HPSM à des sites récepteurs de la cellule adipeuse est de type somatotrope; cette localisation est compatible avec l'influence des hormones possédant une activité somatotrope sur le métabolisme des lipides.

Nos recherches sur l'hormone placentaire somato-mammotrope bovine avaient pour but final, la mise au

point d'un dosage radioimmunologique spécifique et sensible, permettant la détermination des concentrations sériques de l'hormone et, par la même occasion d'évaluer la possibilité d'utiliser son dosage comme diagnostic de la gestation.

L'immunisation de lapins et de cobayes, au moyen d'une préparation d'HPSM purifiée et douée d'un niveau élevé d'activité, a permis d'obtenir des antisérums très spécifiques.

La sensibilité du dosage radioimmunologique a été améliorée par une préincubation du sérum à doser avec l'antisérum concentré.

Les teneurs d'HPSM native présente dans les cotylédons, déterminées au moyen du dosage radioimmunologique, ne diffèrent pas significativement de celles obtenues par la méthode basée sur la liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires.

Les cotylédons foetaux sont trois à quatre fois plus riches en hormone que les cotylédons maternels; cette observation plaide en faveur de l'origine trophoblastique de l'hormone.

Les faibles concentrations d'HPSM mesurées dans les liquides amniotiques et allantoïdiens sont vraisemblablement liées à une métabolisation rapide de l'hormone par le fœtus. De plus, la très faible teneur en prolactine de ces liquides semble infirmer une quelconque sécrétion de prolactine par le placenta bovin.

Les concentrations du sérum foetal en HPSM, en prolactine et en hormone de croissance ont été déterminées à partir du 2^e - 3^e mois de la vie foetale. Elevée chez les fœtus les plus jeunes, la concentration en HPSM diminue régulièrement en fonction de l'âge. Par contre, celle de l'hormone de croissance varie considérablement d'un individu à l'autre et ne permet pas d'établir un profil typique. La prolactine n'est dosable chez le fœtus bovin qu'après le 4^e mois de la

gestation; son niveau reste relativement faible jusqu'à la naissance.

Chez la vache gestante, l'HPSM apparaît dans le sérum entre le 26^e et le 110^e jour de la gestation. Sa concentration augmente régulièrement en fonction de l'avancement de la gravidité et semble atteindre les niveaux les plus élevés (1 à 2 ng/ml) durant les dernières semaines.

Nos résultats sont très différents de ceux de Bolander et coll.,(1976) qui déterminent des teneurs de 600 à 1.000 ng/ml et qui mettent en évidence une différence de concentration entre les vaches de race laitière et celles de race viandeuse. La différence entre les teneurs précisées par ces auteurs et par nous s'explique sans doute par l'isolement de protéines également très différentes.

Nos recherches ont permis d'établir que chez la vache gestante, l'HPSM est dosable dans tous les sérums testés, à partir du 110^e jour de la gestation et ce jusqu'au moment de la parturition. Ce délai tardif, survenant après la possibilité de diagnostiquer la gestation par palpation rectale - réalisable à partir du 60^e jour - rend le dosage de l'HPSM de portée pratique limitée pour établir ou confirmer le diagnostic de gravidité.

Dans le cadre de recherches orientées sur l'endocrinologie et l'étude du métabolisme durant la gestation, l'utilisation du dosage radioimmunologique de l'HPSM rend désormais accessible la détermination des concentrations de cette hormone au cours de différents états physiologiques (gestation gémellaire, primi- ou multiparité) et pathologiques (toxémie, acétonémie, momification foetale, avortement).

- Nos études ont porté en premier lieu sur l'isolement et la purification de l'hormone somato-mammotrope (HPSM) bovine à partir des cotylédons foetaux de placentas provenant de vaches gestantes de 3 à 6 mois.
- La préparation d'HPSM purifiée s'est avérée homogène à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.
- Déterminé par comparaison avec celui de différentes protéines connues, le poids moléculaire de l'HPSM se situe à 33.000 daltons. Son point isoélectrique est de 5,2
- Dans les dosages de la prolactine et de l'hormone de croissance par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires, l'HPSM présente une activité bifonctionnelle, supérieure à celle des préparations de référence (prolactine PRL-NIH-B4 et hormone de croissance GH-NIH-B18).
- Marquée à l'iode 125 , une partie de l'HPSM conserve intactes ses caractéristiques de liaison. L'HPSM 125 I se lie aux récepteurs hépatiques et mammaires, confirmant l'activité bifonctionnelle de l'hormone.
- Une liaison spécifique de l'HPSM 125 I est observée chez la vache au niveau de différents tissus tels la glande mammaire, le foie, le corps jaune, l'endomètre et le tissu adipeux.
- La glande mammaire bovine comporte des sites de liaison différents et spécifiques pour la prolactine et l'hormone de croissance.

- L'immunisation de lapins au moyen de l'HPSM purifiée a permis l'obtention d'antisérums spécifiques, autorisant la mise au point d'un dosage radioimmunologique sensible.
- Les cotylédons foetaux sont trois à quatre fois plus riches en hormone que les cotylédons maternels.
- Le dosage de l'HPSM dans les liquides amniotiques et allantoïdiens révèle leur faible teneur en hormone.
- La concentration en HPSM du sérum est élevée chez les foetus jeunes, elle diminue ensuite régulièrement en fonction de l'âge.
- L'HPSM apparaît dans le sérum maternel entre le 26^e et le 110^e jour de la gestation. Ensuite, sa concentration s'élève régulièrement jusqu'à la parturition.

- ALLEN, W.R. (1969).
A quantitative immunological assay for pregnant mare serum gonadotrophin.
J.Endocr., 43, 581-591.
- ALLEN, W.R. (1975).
The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progesterone production in equids.
J.Reprod.Fert., Suppl. 23, 405-413.
- ALLEN, W.R. et MOOR, R.M. (1972).
The origin of the equine endometrial cups. *I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells.*
J.Reprod.Fert., 29, 313-316.
- ALLOJ, S. et EDELHOCH, H. (1971).
The molecular properties of human chorionic somatomammotropin.
J.Biol.Chem., 246, 5047-5052.
- AMOROSO, E.C. (1955).
Endocrinology of pregnancy.
Brit.Med.Bull., 11, 117-125.
- ANDREWS, P. (1969).
Molecular weight of human placental lactogen investigated by gel filtration.
Biochem.J., 111, 799-800.
- ARBIB, G et JORE D'ARCES, P. (1954).
Essai d'une méthode de diagnostic de la gestation chez les femelles bovines.
Bul.Acad.Vét., 27, 39-42.
- ASCHHEIM, S et ZONDEK, B. (1927).
Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormone im Harn von Schwangeren.
Kin.Wschr., 6, 1322.
- ASCHHEIM, S et ZONDEK, B. (1928a).
Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn (durch Hormonnachweis).
Klin.Wschr., 7, 8-9.
- ASCHHEIM, S et ZONDEK, B. (1928b).
Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn durch Nachweis des Hypophysenvorderlappenhormons.
Klin.Wschr., 7, 1404-1411.
- AXEN, R., PORATH, J et ERNABACK, S. (1967).
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
Nature, 214, 1302-1304. 

- BEAL, W.E., LUKASZEWSKA, J.H. et HANSEL, W. (1981).
Luteotropic effects of bovine blastocysts.
J.Anim.Sci., 52, 567-574.
- BECK, P. (1970).
Reversal of progesteron-enhanced insulin production by human chorionic somatomammotropin.
Endocrinology, 87, 311-315.
- BECK, P et DAUGHADAY, W.H. (1967).
Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man.
J.Clin.Invest., 46, 103.
- BECK, J.S., GORDON, R.L., DONALD, D et MELVIN, J.M.O. (1969).
Characterisation of antisera to a growth-hormone-like placental antigen (human placental lactogen): immunofluorescence studies with these sera on normal and pathological syncytiotrophoblast.
J.Path., 97, 545-555.
- BECK, P., PARKER, M.L. et DAUGHADAY, W.H. (1965).
Radioimmunologic measurement of human placental lactogen in plasma by a double antibody method during normal and diabetic pregnancies.
J.Clin.Endocrinol.Metab., 25, 1457-1462.
- BECKERS, J.F., BALLMAN, P., ECTORS, F. et DERIVAUX, J. (1975a).
Aperçu sur les méthodes de dosage des stéroïdes.
Ann.Méd.Vét., 119, 37-50.
- BECKERS, J.F., BALLMAN, P., ECTORS, F. et DERIVAUX, J. (1975b).
Le dosage radioimmunologique de la progestérone plasmatique chez la vache.
C.R.Acad.Sc., Paris, 280, 335-338.
- BECKERS, J.F., CLOSSET, J., MAGHUIN-ROGISTER, G et HENNEN, G. (1977).
Bovine follitropin. Isolation and characterization of the native hormone and its α and β subunits.
Biochimie, 59, 825-831.
- BECKERS, J.F., DE COSTER, R., WOUTERS-BALLMAN, P., FROMONT-LIENARD, C., VAN DER ZWALMEN, P et ECTORS, F. (1982).
Dosage radioimmunologique de l'hormone placentaire somatotrope et mammatrope bovine.
Ann.Méd.Vét., 126, 9-21.
- BECKERS, J.F. et ECTORS, F. (1981).
Dosage de l'hormone placentaire somatotrope et mammatrope bovine par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires.
Ann.Méd.Vét., 125, 311-319.

- BECKERS, J.F., FROMONT-LIENARD, Ch., VAN DER ZWALMEN, P., WOUTERS-BALLMAN, P. et ECTORS, F. (1980).
Isolement d'une hormone placentaire bovine présentant une activité analogue à la prolactine et à l'hormone de croissance.
Ann.Méd.Vét., 124, 584-601.
- BECKERS, J.F., WOUTERS-BALLMAN, P., ECTORS, F. et DERIVAUX, J. (1978).
Induction de l'oestrus chez les génisses en anoestrus fonctionnel.
Ann.Méd.Vét., 122, 597-605.
- BELLISARIO, R., CARLSEN, R.B. et BAHL, Om P. (1973).
Human chorionic gonadotropin. *Linear amino acid sequence of the α subunit.*
J.Biol.Chem., 248, 6796-6809.
- BERTHELON, M. (1937).
Diagnostic biologique de la gestation.
Rec.Méd.Vét., 113, 680-695.
- BERTRAND, M et FERNEY, J. (1957).
Les possibilités du diagnostic expérimental de la gestation chez la vache.
Les cahiers de médecine vétérinaire, 26(2), 33-53.
- BETTERIDGE, K.J. (1977).
Embryo transfer in farm animals. *A review of techniques and applications.* Ed. Betteridge, K.J. Canada Department of Agriculture. Monograph 16, p.2.
- BEWLEY, T.A. et LI, C.H. (1971).
Circular dichroism studies in human chorionic somatomammotropin.
Arch.Biochem.Biophys., 144, 589-595.
- BOHN, H. (1979).
Placental and pregnancy proteins.
Carcino-Embryonic proteins, Vol.I, Ed.F.G. Lehmann Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, p. 289-299.
- BOLANDER, F.F.Jr. et FELLOWS, R.E. (1976).
Purification and characterization of bovine placental lactogen.
J.Biol.Chem., 251, n°9, 2703-2708.
- BOLANDER, F.F.Jr., ULBERG, L.C. et FELLOWS, R.E. (1976).
Circulating placental lactogen levels in dairy and beef cattle.
Endocrinology, 99, 1273-1278.
- BREMEL, R.D., ARIMA, Y et EAKLE, K.A. (1980).
Characterization of bovine placental lactogen.
J.Dairy Science, Suppl.1, 92, Abst.p.77.

- BRODY, S. (1969).
Protein hormones and hormonal peptides from the placenta.
Dans: Foetus and placental (Klopper, A & Dicsfalussy, E. Eds),
pp.299-413. Adlard & Sons, Surrey, England.
- BUTTLE, H.L., Forsyth, I.A. (1976).
Placental lactogen in the cow.
J.Endocr., 68, 141-146.
- BUTTLE, H.L., FORSYTH, I.A. et KNAGGS, G. . (1972).
Plasma prolactin measured by radioimmunoassay and bioassay
in pregnant and lactating goats and the occurrence of a
placental lactogen.
J.Endocr., 53, 483-491.
- CALLIGA, B., GUEGUEN, J., JAYLE, M.F. et LACOMME, M. (1965).
Intérêt du dosage des oestrogènes et du prégnandiol au cours
des 2^e et 3^e trimestres de grossesses pathologiques.
Presse Méd., 73, 2085-2087.
- CARLSEN, R.B., BAHL, Om P. et SWAMINATHAN, N. (1973).
Human chorionic gonadotropin. *Linear amino acid sequence of
the β subunit.*
J.Biol.Chem., 248, 6810-6827.
- CARR, D et FRIESEN, H.G. (1976).
Growth hormone and insulin binding to human liver.
J.Clin.Endocrinol.Metab., 42, 484-493.
- CASIDA, L.E. et WARWICK, E.J. (1945).
The necessity of the corpus luteum for maintenance of pregnan-
cy in the ewe.
J.Anim.Sci., 4, 34-36.
- CATT, K.J., DUFAU, M.L. et TSURUHARA, T. (1972).
Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and
chorionic gonadotropin.
J.Clin.Endocrinol.Metab., 34, 123-132.
- CERINI, M., FINDLAY, J.K. et LAWSON, R.A.S. (1976).
Pregnancy-specific antigens in the sheep: application to
the diagnosis of pregnancy.
J.Reprod.Fert., 46, 65-69.
- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A. et FRIESEN, H.G. (1976).
The purification and characterization of ovine placental
lactogen.
Endocrinology, 98, 65-76.

- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A. et FRIESEN, H.G. (1978a).
Maternal and fetal concentrations of ovine placental lactogen measured by radioimmunoassay.
Endocrinology, 102, 1606-1613.
- CHAN, J.S.D., ROBERTSON, H.A. et FRIESEN, H.G. (1978b).
Distribution of binding sites for ovine placental lactogen in the sheep.
Endocrinology, 102, 632-640.
- CHANG, M.C. (1952).
Development of bovine blastocyst with a note on implantation.
Anat. Rec., 113, 143-161.
- CHOCHINOV, R.H., KETUPANYA, A., MARIZ, I.K., UNDERWOOD, L.E. et DAUGHADAY, W.H. (1976).
Amniotic fluid reactivity detected by somatomedin C radio-receptor assay: correlation with growth hormone, prolactin and fetal renal maturation.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 42, 983-986.
- CHRISTAKOS, S et BAHL, Om P. (1979).
Pregnant mare serum gonadotropin. *Purification and physico-chemical, biological and immunological characterization.*
J. Biol. Chem., 254, 4253-4261.
- CLEGG, M.T., BODA, J.M. et COLE, H.P. (1954).
The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin.
Endocrinology, 54, 448-463.
- COLE, H.H. et HART, G.H. (1930).
The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat.
Am. J. Physiol., 93, 57-68.
- COLE, H.H. et HART, G.H. (1942).
Diagnosis of pregnancy in the mare by hormonal means.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 101, 124-128.
- COWIE, A.T., FORSYTH, I.A. et HART, I.C. (1980).
Hormonal control of lactation. Dans: *Monographs on Endocrinology*, (Gross, F., Grumbach, M.M., Labhart, A., Lipsett, M.B., Mann, T., Samuels, L.T., Zander, J. Eds) Vol. 15, pp. 146-229.
Springer-Verlag Berlin. Heidelberg-New York.
- CUBONI, E. (1958).
Neuere Hinweise zur Ausführung der Trächtigkeitsdiagnose bei der Stute.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 71, 108-110.

- CURRIE, A.R., BECK, S.J., ELLIS, S.T. et READ, C.H. (1966).
Immunofluorescent localization of a growth hormone-like factor in normal and abnormal syncytiotrophoblast.
J.Path.Bact., 92, 395-399.

- DALE, G et LATNER, A.L. (1968).
Isoelectric focusing in polyacrylamide gels.
The Lancet ii, 847-848.

- DAVIS, B.J. (1964).
Disc electrophoresis. *II. Method and application to human serum proteins.*
Annals N.Y.Acad.Sci., 121, 404-427.

- DAYHOFF, M.O., ECK, R.V. et PARK, C.M. (1972).
A model of evolutionary change in proteins. Dans: Atlas of protein sequence and structure (Dayhoff, M.O., ed), Vol. 5, pp.89-99. Nat.Biomed.Res.Found., Washington.

- DE COSTER, R., BECKERS, J.F., WOUTERS-BALLMAN, P. et ECTORS, F. (1979)
Variations nycthémerales de la testostérone et de la lutropine plasmatique chez le chien.
Ann.Méd.Vét., 123, 423-428.

- DE COSTER, R., CAMBIASO, C.L. et MASSON, P.L. (1980).
Immunological diagnosis of pregnancy in the mare by agglutination of latex particles.
Theriogenology, 13, 433-436.

- de IKONICOFF, L.K., HUBERT, C et CEDARD, L. (1971).
Etude histochimique du placenta humain. Localisation de l'hormone chorionique somatomatotrophique par des techniques immunohistochimiques. Caractérisation d'un sérum spécifique.
C.R.Acad.Sci., Paris, 272, 2938-2941.

- DELAHAUT, Ph., BECKERS, J.F. et ECTORS, F. (1979).
Effet de l'Azide de sodium sur la dégradation de la progesterone dans les échantillons de sang total chez les bovins.
Ann.Méd.Vét., 123, 567-572.

- DERIVAUX, J., ECTORS, F. et BECKERS, J.F. (1976a).
Données récentes en gynécologie animale.
Ann.Méd.Vét., 120, 81-102.

- DERIVAUX, J., ECTORS, F. et BECKERS, J.F. (1976b).
Prostaglandines et cycle sexuel chez les animaux domestiques.
Bull.Acad.Roy.Méd., 131, 359-380.

- DERIVAUX, J., ECTORS, F. et BECKERS, J.F. (1976c).
Climat hormonal et troubles fonctionnels ovariens.
Congrès d'Endocrinologie Vétérinaire, Wels, Autriche, 30 septembre au 3 octobre 1976.

- DJIANE, J., DURAND, Ph. et KELLY, P.A. (1977).
Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation.
Endocrinology, 100, 1348-1356.
- DRABKIN, D.L. (1946).
Spectrophotometric studies. XIV *The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species.*
J. Biol. Chem., 164, 703-723.
- EAKLE, K.A., ARIMA, Y., SWANSON, P., GRIMEK, H. et BREMEL, R.D. (1982).
A 32.000 molecular weight protein from bovine placenta with placental lactogen-like activity in radioreceptor assays.
Endocrinology, 110, 1758-1765.
- ECTORS, F., BECKERS, J.F., BALLMAN, P. et DERIVAUX, J. (1975).
Variations du 17 β oestradiol au cours du cycle oestral chez la vache.
C.R. Acad. Sci., Paris, 281, 1257-1260.
- EVANS, H.M., SIMPSON, M.E., MARX, W. et KIBRICK, E. (1943).
Bioassay of the pituitary growth hormone. Width of the proximal epiphysial cartilage of the tibia in hypophysectomized rats.
Endocrinology, 32, 13-16.
- FANG, V.S. et KIM, M.M. (1975).
Study on maternal, fetal and amniotic human prolactin at term.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 41, 953-967.
- FELDMAN, H.A. (1972).
Mathematical theory of complexe ligand-binding systems of equilibrium: some methods for parameter fitting.
Anal. Biochem., 48, 317.
- FELLOWS, R.E., HURLEY, T. MAURER, W. et HANDWERGER, S. (1974).
In 56th Annual meeting of the Endocrinology Society, Atlanta, Abstr. 116, p.A-113. J.B. Lippincott, Co, Philadelphia.
- FLORINI, J.R., TONELLI, G., BREUER, C.B., COPPOLA, J., RINGLER, I. et BELL, P.H. (1966).
Characterization and biological effects of purified placental protein (human).
Endocrinology, 79, 692-708.
- FOOTE, W.C. et KAUSHIK, D.K. (1963).
LH activity in bovine reproductive tissue.
J. Anim. Sci., 22, 857-858.

- FOSTER, T.S. (1956).
Gonadotrophins of bovine blood and urine.
Can. J. Agric. Sci., 36, 463-470.
- FRANCHIMONT, P., GASPARD, U., REUTER, A. et HEYNEN, G. (1972).
Polymorphism of protein and polypeptide hormones.
Clin. Endocr., 1, 315-336.
- FRIEDMANN, M.H. (1929).
Effect of injections of urine from pregnant women on ovary
of the rabbit.
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 26, 720-721.
- FRIESEN, H. (1965).
Purification of a placental factor with immunological and
chemical similarity to human growth hormone.
Endocrinology, 76, 369-381.
- FUKUSHIMA, M. (1951).
Studies on somatotropic hormone secretion in gynecology and
obstetrics.
Tohoku J. Exper. Med., 74, 161-174.
- GAILLI-MAININI, C. (1947).
Pregnancy test using the male toad.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 7, 653-658.
- GALLOT, G. et ROUSSEL, G. (1935).
Diagnostic de la gestation chez la jument.
C.R. Soc. Biol., 119, 1249-1250.
- GASPARD, U. (1980).
Les hormones protéiques placentaires.
Ed. Masson (Paris, New-York, Barcelone, Milan).
- GERASIMO, P., DJIANE, J. et KELLY, P.A. (1979).
Titration of total binding sites for growth hormone in rabbit
liver.
Quantitative modifications of these sites during pregnancy.
Molecular and Cellular Endocrinology, 13, 11-23.
- GOCKE, D.J., GERTEN, J., SHERWOOD, L.M. et LARAGH, J.H. (1969).
Physiological and pathological variations of plasma angio-
tensin II. in man. *Correlation with renin activity and sodium
balance.*
Circulation Research, 24-25, Suppl. 1, 131-148.
- GODKIN, J.D., COTE, C. et DUBY, R.T. (1978).
Embryonic stimulation of ovine and bovine corpora lutea.
J. Reprod. Fert., 54, 375-378.

- GOLANDER, A., BARRETT, J.R., TYREY, L. et FLETCHER, W.H. (1978).
Differential synthesis of human placental lactogen and human chorionic gonadotropin *in vitro*.
Endocrinology, 102, n°2, 597-605.
- GOSPODAROWICZ, D. et PAPKOFF, H. (1967).
A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotropin.
Endocrinology, 80, 699-702.
- GREENSPAN, F.S., LI, C.H., SIMPSON, M.E. et EVANS, H.M. (1949).
Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test.
Endocrinology, 45, 455-463.
- GREENSTEIN, J.S., MURRAY, R.W. et FOLEY, R.C. (1958).
Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation.
Anat. Rec., 132, 321-341.
- GRUMBACH, M.M. et KAPLAN, S.L. (1964).
On the placental origin and purification of chorionic "growth hormone-prolactin" and its immunoassay in pregnancy.
Trans. N.Y. Acad. Sci., 27, 167-188.
- HANDWERGER, S., CRENSHAW, C. Jr., MAURER, W.F., BARRETT, J., HURLEY, T.W., GOLANDER, A. et FELLOWS, R.E. (1977).
Studies on ovine placental lactogen secretion by homologous radioimmunoassay.
J. Endocr., 72, 27-34.
- HANDWERGER, S., MAURER, W., BARRETT, J., HURLEY, .W. et FELLOWS, R.E. (1974).
Evidence for homology between ovine and human placental lactogens.
Endocr. Res. Commun., 1, 403-413.
- HARBOE, N. et INGILD, A. (1973).
Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre.
Scand. J. Immunology., Suppl. 1, 161-165.
- HARTMANN, L. et TOILLIEZ, M. (1957).
Micro-méthode d'étude en gélose de la réaction antigène-anticorps (variante du procédé d'Ouchterlony).
Rev. Franç. études Clin. et Biol., 2, 197-199.
- HAYDEN, T.J. et FORSYTH, I.A. (1979).
Bovine placental lactogen: purification and characterization.
J. Endocr., 80, Abstr. p.68.

- HEAP,R.B.,GWYN,M.,LAING,J.A. et WALTERS,D.E. (1973).
Pregnancy diagnosis in cows;changes in milk progesterone concentration during the oestrous cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunoassay.
J.Agric.Sci.,Camb.,81,151-157.
- HEAP,R.B. et HAMON,M. (1979a).
Oestrone sulphate in milk as an indicator of a viable conceptus in cows.
Br.Vet.J.,135,355-363.
- HEAP,R.B. et HAMON,M. (1979b).
Oestrone sulphate in milk and its association with pregnancy.
Br.Vet.J.,135,462-463.
- HEAP,R.B. et HOLDSWORTH,J. (1981).
Modern diagnostic methods in practice. *Hormone assays in reproduction and fertility*.
Br.Vet.J.,137,561-571.
- HENNEN,G.,VAN DALEM,J.L.,PIRENS,G.,CLOSSET,J.,MAGHUIN-ROGISTER,G.,GASPARD,U. et FIRQUET,J. (1976).
Glycoprotein hormones: Molecular characteristics and specific measurements during pregnancy.
Dans: Protids of biological fluids,H.Peeters (éd.),Oxford, Pergamon Press,53-60.
- HOFFMANN,B. (1977).
Bestimmung von Steroidhormonen beim Weiblichen Rind.
Entwicklung von Messverfahren und Physiologische Daten.
Fortschritte der Veterinärmedizin. Beihefte zum Zentralblatt für veterinärmedizin,Heft 26.
Paul Parey éd. Berlin und Hamburg.
- HOFFMANN,B.,HAMBURGER,R et HOLLWICH,W. (1977).
Bestimmung von Progesteron direkt in Milchfett als verbessertes Verfahren zur Fertilitätskontrolle bei der Kuh.
Zuchthyg.,12,1-7.
- HOLLADAY,L.A. et PUETT,D. (1977).
Comparative conformational analysis of human chorionmammotropin and somatotropin from several species.
Int.J.Peptide Protein Res.,10,363-368.
- HUGHES,J.P. (1979).
Identification and characterization of high and low affinity binding sites for growth hormone in rabbit liver.
Endocrinology,105,n°2,414-420.
- HUMBLLOT,P. (1981).
Physiologie de la reconnaissance embryo-maternelle chez la vache.
Rec.Méd.Vét.,157,(1),39-52.

- HUNTER, W.M. (1971).
The preparation and assessment of iodinated antigens.
dans: Radioimmunoassay methods, (Kirkham, K.E. et Hunter, W.M.,
eds) p.3-23, Churchill Livingstone, Edinburgh et London.

- HURLEY, T.W., D'ERCOLE, A.J., HANDWERGER, S., UNDERWOOD, L.E.,
FURLANETTO, R.W. et FELLOWS, R.E. (1977).
Ovine placental lactogen induces somatomedin: a possible
role in fetal growth.
Endocrinology, 101, 1635-1638.

- IKEMOTO, S., MUKOYAMA, H. et SUZUKI, S. (1964).
Immunological studies of pregnant mare serum gonadotropin
(PMSG) I. Preparation of anti-PMSG and its application to
the pregnancy test.
Proc. Japan Acad., 41, 679-682.

- IKEMOTO, S., MUKOYAMA, H., SUZUKI, S. et FURUHATA, T. (1965).
Immunological studies of pregnant mare serum gonadotropin
(PMSG) II. Preparation of pure serum gamma-globulin on anti-
PMSG rabbit serum.
Proc. Japan Acad., 41, 428-432.

- JAYLE, M.F. et HENRY, R. (1965).
Comparaison des taux des gonadotropines chorioniques et des
stéroïdes hormonaux urinaires au cours des grossesses normales
et pathologiques.
Dans: Hormonologie de la grossesse humaine. Gauthier-Villars,
Paris, 297-316.

- JAYLE, M.F., SCHOLLER, R., BEGUE, J. et HANNS, L. (1965).
Oestrogènes, progestérone et leurs métabolites dans le sang
et les urines de grossesses normales.
dans: Hormonologie de la grossesse humaine. Gauthier-Villars,
Paris, 49-104.

- JONES, G.E.S., DELFS, E. et STRAN, H.M. (1944).
Chorionic gonadotropin and pregnanediol values in normal
pregnancy.
Bull. Johns Hopkins Hosp., 75, 359-376.

- JOSIMOVICH, J.B. et MacLAREN, J.A. (1962).
Presence in the human placenta and term serum of a highly
lactogenic substance immunologically related to pituitary
growth hormone.
Endocrinology, 71, 209-220.

- JOSIMOVICH, J.B., MERISKO, B.K. et BOCCELLA, L. (1977).
Amniotic prolactin control over amniotic and fetal extra-cellular fluid water and electrolytes in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 100, 564.

- KAPLAN, S.L. et GRUMBACH, M.M. (1964).
Studies of a human and simian placental hormone with growth hormone-like and prolactin-like activities. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 24, 80-100.

- KARG, H., HOFFMANN, B. et SCHAMS, D. (1970).
Luteinizing hormone, prolactin and progesterone relationships *in vivo* (data from the cow). *Proc. 3rd Int. Congr., Hamburg, september 1970, Excerpta Medica, ICS n° 219, Hormonal Steroids*, 691-697.

- KEKWICK, R.A. (1940).
The serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem. J.*, 34, 1248-1257.

- KELLY, P.A., ROBERTSON, H.A. et FRIESEN, H.G. (1974).
Temporal pattern of placental lactogen and progesterone secretion in sheep. *Nature*, 248, 435-437.

- KELLY, P.A., TSUSHIMA, T., SHIU, R.P.C. et FRIESEN, H.G. (1976).
Lactogenic and growth hormone-like activities in pregnancy determined by radioreceptor assays. *Endocrinology*, 99, 765-774.

- KETELSLEGERS, J.M. (1982).
Recherches sur les récepteurs testiculaires de l'hormone lutéinisante et de l'hormone folliculo-stimulante. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur. Université de Liège. Institut de Médecine. Département de Clinique et de Séméiologie médicales.

- KETELSLEGERS, J.M., KNOTT, G.D. et CATT, K.J. (1974).
Computer analysis of the binding reaction between hCG and gonadotropin receptors of the rat testis. Dans : *Hormone binding and target cell activation in the testis* (Dufau, M.L. et Means, A.R., eds). *Current Topics in molecular endocrinology, Vol. 1*, pp. 31-45 Plenum Press New-York et London.

- KNOTT, G.D. et REECE, D.K. (1972).
MLAB: A civilized curve-fitting system. Dans: *Proceedings of the online '72 International Conference. Vol. 1*, pp. 497-526. Brunel University, England.

- KNOTT,G.D. et SHRAGER,R.I. (1972).
On-Line modeling by curve-fitting .
Dans: Computer graphics: Proceedings of the Siggraph Computers
in Medicine Symposium, Vol.6,n°4,pp.138-151. ACM,Siggraph
Notices.
- KOBER,S. (1931).
Eine kolorimetrische Bestimmung des Brunsthormons (Menformon).
Biochem.Zeitschr.,239,209-212.
- KOEPKE,J.A.,THOMA,J.F. et SCHMIDT,R.M. (1975).
Identification of human hemoglobins by use of isoelectric
focusing in gel.
Clin.Chem.,21,1953-1955.
- KOSASA,T.S.,LEVESQUE,L.A.,GOLDSTEIN,D.P. et TAYMOR,M.L.(1974a).
Clinical use of a solid-phase radioimmunoassay specific for
human chorionic gonadotropin.
Am.J.Obstet.Gynecol.,119,784-791.
- KOSASA,T.S.,LEVESQUE,L.A.,TAYMOR,M.L. et GOLDSTEIN,D.P. (1974b).
Measurement of early chorionic activity with a radioimmuno-
assay specific for human chorionic gonadotropin following
spontaneous and induced ovulation.
Fertil.Stril.,25,211-216.
- LACROIX,M.C. et MARTAL,J. (1979).
Mise en évidence et évolution d'une gonadotrophine chorioique
chez la brebis.
C.R.Acad.Sci.,Paris,288,771-774.
- LEABACK,D.H. et RUTTER,A.C. (1968).
Polyacrylamide-isoelectric-focusing. A new technique for
the electrophoresis of proteins.
Biochem.Biophys.Res.Commun.,32,447-453.
- LEAKE,N.H. et BURT,R.L. (1969).
Effect of hPL and pregnancy on glucose uptake in rat adipose
tissue.
Am.J.Obstet.Gynecol.,103,39.
- LECLERCQ,M. et DERIVAUX,J. (1962).
Détermination des oestrogènes urinaires chez la vache en
fin de gestation.
Annales d'endocrinologie, 23,105-109.
- LEE,C.Y. et RYAN,R.J. (1973).
Interaction of ovarian receptors with human luteinizing
hormone and human chorionic gonadotropin.
Biochemistry,12,4609.

- LEE, C.Y. et RYAN, R.J. (1975).
Radioreceptor assay for human chorionic gonadotropin.
J.Clin.Endocrinol.Metab., 40, 228-233.
- LESBOUYRIES, BERTHELON et HENNION (1937).
La folliculinurie chez la vache.
Bul.Acad.Vét., 10, 261-265.
- LI, C.H. et DIXON, J.S. (1971).
Human pituitary growth hormone . XXXII. *The primary structure of the hormone: revision.*
Arch.Biochim. Biophys., 146, 233-236.
- LI, C.H., DIXON, J.S. et CHUNG, D. (1971).
Primary structure of the human chorionic somatomammotropin (hCS) molecule.
Science, 173, 56-58.
- LI, C.H., DIXON, J.S. et CHUNG, D. (1973).
Amino acid sequence of human chorionic somatomammotropin.
Arch.Biochem.Biophys., 155, 95-110.
- LONGSWORTH, L.G. (1941).
The influence of pH on the mobility and diffusion of ovalbumin.
Annals.N.Y.Acad.Sci., 41, 267-285.
- LOUVET, J.P., HARMAN, S.M., NISULA, B.C., ROSS, G.T., BIRKEN, S. et CANFIELD, R. (1976).
Follicle stimulation activity of human chorionic gonadotropin: effect of dissociation and recombination of subunits.
Endocrinology, 99, 1126-1128.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951).
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem., 193, 265-275.
- LUKASZEWSKA, J. et HANSEL, W. (1980).
Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow.
J.Reprod.Fert., 59, 485-493.
- LYONS, W.R. et PAGE, E. (1935).
Detection of mammatropin in the urine of lactating women.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 32, 1049-1050.
- MALAISSE, W.J., MALAISSE-LAGAE, F., PICARD, C. et FLAMENT-DURAND, J. (1969).
Effects of pregnancy and chorionic growth hormone upon insulin secretion.
Endocrinology, 84, 41-44.

- MARSHALL, J. R., HAMMOND, C. B., ROSS, G. T., JACOBSON, A., RAYFORD, P. et ODELL, W. D. (1968).
Plasma and urinary chorionic gonadotropin during early human pregnancy.
Obstet. Gynecol., 32, 760-764.
- MARTAL, J. (1980).
L'hormone lactogène placentaire ovine.
Purification et propriétés physicochimiques immunologiques et biologiques.
Etude de son rôle dans les mécanismes du contrôle de la gestation.
Thèse de Doctorat d'état en Sciences Biologiques présentée à l'Université de Paris-Sud centre d'Orsay.
- MARTAL, J. et DJIANE, J. (1975).
Purification of a lactogenic hormone in sheep placenta.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 770-773.
- MARTAL, J. et DJIANE, J. (1977).
Mammothrophic and growth promoting activities of a placental hormone in sheep.
J. Steroid Bioch., 8, 415-417.
- MARTAL, J., DJIANE, J. et DELOUIS, C. (1975).
Isolation and characterization of an ovine placental lactogenic hormone.
Dans: Proc. Int. Symp. on Growth hormone and related peptides. Milan, Suppl. 1, p. 125, *Ricerca Scientifica*, Ed. Educazione Permanente, Milan.
- MARTAL, J., DJIANE, J. et DELOUIS, C. (1976).
Purification and lactogenic activity of an ovine placental hormone.
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 16, 162 (Abstr.)
- MARTAL, J., DJIANE, J. et DUBOIS, M. P. (1977).
Immunofluorescence localization of ovine placental lactogen.
Cell. Tiss. Res., 184, 427-433.
- MARX, W., SIMPSON, M. E. et EVANS, H. M. (1942).
Endocrinology, 30, 1.
- MASSIP, A., WOUTERS-BALLMAN, P., BECKERS, J. F. et ECTORS, F. (1977).
Evolution du taux de cortisol plasmatique chez le veau de la naissance à l'âge de 14 jours.
C. R. Acad. Sci., Paris, 285, 563-565.
- McDONALD, L. E., McNUTT, S. H. et NICHOLS, R. E. (1953).
On the essentiality of the bovine corpus luteum of pregnancy.
Am. J. Vet. Res., 14, 539-541.

- MIDGLEY, A.R. Jr. et PIERCE, G.B. Jr. (1962).
Immunohistochemical localization of human chorionic gonadotropin.
J. Exp. Med., 115, 289-296.
- MIDGLEY, A.R. Jr. et RAM, J.S. (1965).
Radioimmunoassay of human chorionic gonadotropin (hCG) and human pituitary luteinizing hormone (LH).
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. Med., 24, 162 (Abstr.)
- MILLER, W.C. (1935).
Biological methods of diagnosing equine pregnancy I. *The mouse test*.
Proc. Roy. Soc. London (B), 116, 237-247.
- MISHELL, D.R. Jr., NAKAMURA, R.M., BARBERIA, J.M. et THORNEYCROFT, I.H. (1974).
Initial detection of human chorionic gonadotropin in serum in normal human gestation.
Am. J. Obstet. Gynecol., 118, 990-991.
- MOODBIDRI, S.B., SHETH, A.R. et RAO, S.S. (1973).
Binding of radioiodinated human placental lactogen to buffalo corpus luteum *in vitro*.
J. Reprod. Fert., 35, 453-460.
- MOOR, R.M., ALLEN, W.R. et HAMILTON, D.W. (1975).
Origin and histogenesis of equine endometrial cups.
J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 391-396.
- MORGAN, F.J., BIRKEN, S. et CANFIELD, R.E. (1975).
The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. *The α subunit and β subunit*.
J. Biol. Chem., 250, 5247-5258.
- MURTHY, G.S., SCHELLENBERG, C et FRIESEN, H.G. (1982).
Purification and characterization of bovine placental lactogen.
Endocrinology, 111, n°6, 2117-2124.
- NELSON, C.A. (1971).
The binding of detergents to proteins. I. *The maximum amount of Dodecyl sulfate bound to proteins and the resistance to binding of several proteins*.
J. Biol. Chem., 246, 3895-3901.
- NIALL, H.D., HOGAN, M.L., SAUER, R., ROSENBLUM, I.Y. et GREENWOOD, F.C. (1971).
Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 68, 866-869.

- NORTHEY, D.L. et FRENCH, L.R. (1980).
Effect of embryo removal and intrauterine infusion of embryonic homogenates on the lifespan of the bovine corpus luteum.
J. Anim. Sci., 50, 298-302.

- OBIKWE, B.C., GRUDZINSKAS, J.G. et CHARD, T (1980).
Placental protein 5 : distribution and physiological variations in late pregnancy.
Dans: The human placenta: Proteins and Hormones.
eds. A. Klopper, A. Genazzani and P.G. Crosignani, U.S. Edition published by Academic Press INC. 111, Fifth Avenue, New-York, 10003.

- ORNSTEIN, L. (1964).
Disc electrophoresis. I. *Background and theory*.
Annals N.Y. Acad. Sci., 121, 321-349.

- OUCHTERLONY, O (1948).
In vitro method for testing the toxin-producing capacity of Diphtheria Bacteria.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 25, 186-191.

- OUCHTERLONY, O (1949).
Antigen-antibody reactions in gels.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507-515.

- PAPKOFF, H. (1974).
Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 397-404.

- PAPKOFF, H., BEWLEY, T.A. et RAMACHANDRAN, J. (1978).
Physicochemical and biological characterizations of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits.
Biochim. Biophys. Acta, 532, 185-194.

- PARKE, L. et FORSYTH, I.A. (1975).
Assay of lactogenic hormones using receptors isolated from rabbit liver.
Endocr. Res. Commun., 2, 137-149.

- PARLOW, A.F. (1961).
Bio-assay of pituitary luteinizing hormone by depletion of ovarian ascorbic acid.
Dans: Human pituitary Gonadotropins (Albert, A et Thomas, C., Eds) pp. 300-310.

- PARLOW, A.F., WILHELMI, A.E. et REICHERT, L.E. (1965).
Further studies on the fractionation of human pituitary glands.
Endocrinology, 77, 1126-1135.
- PIERCE, J.G. et PARSONS, T.F. (1981).
Glycoprotein hormones: structure and function.
Annual Rev. Biochem., 50, 465-496.
- PITT-RIVERS, R. et IMPIOMBATO, F.S.A. (1968).
The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins.
Biochem. J., 109, 835-830.
- POSNER, B.I., KELLY, P.A., SHIU, R.P.C. et FRIESEN, H.G. (1974).
Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding:
tissue distribution, species variation and characterization.
Endocrinology, 95, 521-531.
- REDDY, S. et WATKINS, W.B. (1978a).
Purification and some properties of ovine placental lactogen.
J. Endocr., 78, 59-69.
- REDDY, S. et WATKINS, W.B. (1978b).
Immunofluorescence localization of ovine placental lactogen.
J. Reprod. Fert., 52, 173-174.
- REISNER, A.H., NEMES, P. et BUCHOLTZ, C. (1975).
The use of Coomassie Brilliant Blue G-250 Perchloric Acid
solution for staining in electrophoresis and isoelectric
focusing on polyacrylamide gels.
Anal. Biochem., 64, 509-516.
- RICHARDS, C.B. (1967).
Simple immunological method for the diagnosis of pregnancy
in mares.
Nature, 215, 1280-1281.
- RICKETTS, A.P. et FLINT, A.P.F. (1980).
Onset of synthesis of progesterone by ovine placenta.
J. Endocr., 86, 337-347.
- RIDDLE, O., BATES, R.W. et DYKSHORN, W. (1933).
The preparation identification and assay of prolactin.
a. *Hormone of the anterior pituitary.*
Am. J. Physiol., 105, 191-216.
- ROBERTSON, H.A., CHAN, J.S.D. et FRIESEN, H.G. (1980).
The use of a pregnancy-specific antigen, chorionic somatomam-
motrophin, as an indicator of pregnancy in sheep.
J. Reprod. Fert., 58, 279-281.

- ROBERTSON, H.A. et SARDA, I.R. (1971).
A ceru early pregnancy test for mammals: its application to the cow, ewe and sow.
J.Endocr., 49, 407-419.
- RODBARD, D. (1973).
Mathematics of hormone-receptor interaction: I. *Basic principles*.
Dans: " Receptors for reproduction hormones" (O'Malley, B.W. et Means, A.R., eds) Adv.Exp.Med.Biol., Vol 36, pp.289-326.
Plenum-Press, N.Y.
- RODABRD, D. (1974).
Statistical quality cotrol and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays.
Clin.Chem., 20, 1255-1270.
- RODBARD, D. et FRAZIER, G.R. (1973).
Radioimmunoassay data processing 2nd ed. Fortran IV-G Program listings (PB 217367) or magnetic tape (PB 217366), U.S. Dept. Commerce, NATIONAL Technical Information Service, Springfield, Va., 1973.
- RODBARD, D. et LEWALD, J.E. (1970).
Computer analysis of radioligand-assay and radioimmunoassay data.
Acta Endocrinol.(Copenhagen), 64, Suppl. 147, 79-92.
- ROULSTON, J.E. (1979).
Validation of the self-displacement technique for estimation of specific radioactivity of radioimmunoassay tracers.
Annals pf Clin.Biochem., 16, 26-29.
- ROWSON, L.E.A. et MOOR, R.M. (1967).
The influence of embryonic tissue homogenate infused into the uterus, on the life-span of the corpus luteum in the sheep.
J.Reprod.Fert., 13, 511-516.
- ROY, B.P., GRINWICH, D.L., MURTHY, G.S. et FRIESEN, H.G. (1977).
Studies on bovine placental lactogen.
Program on the 59th meeting of the endocrine society, Abstr. 354.
- SAXENA, B.B., HASAN, S.H., HAOUR, F. et SCHMIDT-GOLLWITZER, M. (1974).
Radioreceptor assay of human chorionic goandotropin: detection of early pregnancy.
Science, 184, 793-795.
- SCATCHARD, G. (1949).
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Annals N.Y.Acad.Sci., 51, 660-672.

- SCHALCH, D.S. et PARKER, M.L. (1964).
A sensitive double antibody immunoassay for human growth hormone in plasma.
Nature, 203, 1141-1142.
- SCHAUDER, W. (1912).
Untersuchungen über die Eihäute und Embryotropie des Pferdes.
Arch. Anat. Physiol., 259-302.
- SCHENIDER, A.B., KOWALSKI, K. et SHERWOOD, L.M. (1975).
Identification of "Big" human placental lactogen in placenta and serum.
Endocrinology, 97, n°6, 1365-1373.
- SCIARRA, J.J., KAPLAN, S.L. et GRUMBACH, M.M. (1963).
Localization of anti-human growth hormone serum within the human placenta: Evidence for a human chorionic "growth hormone-prolactin".
Nature, 199, 1005-1006.
- SEDLACEK, H.H., REHKOPF, R. et BOHN, H. (1976).
Immunofluorescence histological localization of human pregnancy and placenta proteins in the placenta of man and monkeys (Cynomolgus).
Behring-Inst. Mitt., 59, 81-91.
- SELYE, H., COLLIP, J.B., THOMSON, D.L. (1933).
The effect of hypophysectomy upon pregnancy and lactation.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.), 30, 589.
- SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. et MAIZEL, J.V. Jr. (1967).
Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 815-820.
- SHEARMAN, R.P. (1959).
Some aspects of the urinary excretion of pregnanediol in pregnancy.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp., 66, 1-11.
- SHERWOOD, L.M., HANDWERGER, S., MacLAURIN, W.D. et LANNER, M. (1971).
Amino-acide sequence of human placental lactogen.
Nature, New Biology, 233, 59-61.
- SHIU, R.P.C. et FRIESEN, H.G. (1974).
Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland.
Biochem. J., 140, 301-311.
- SHIU, R.P.C., KELLY, P.A. et FRIESEN, H.G. (1973).
radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones.
Science, 180, 968-971.

- SHOME, B. et PARLOW, A.F. (1977).
Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence.
J.Clin.Endocrinol.Metab., 45, 1112-1115.
- SHORT, R.V. (1958a).
Progesterone in blood. I. *The chemical determination of progesterone in peripheral blood.*
J.Endocr., 16, 415-425.
- SHORT, R.V. (1958b).
Progesterone in blood. II. *Progesterone in the peripheral blood of pregnant cows.*
J.Endocr., 16, 426-428.
- STAPLES, L.D., LAWSON, R.A.S., CERINI, M., SHEERS, M. et FINDLAY, J.K. (1976).
Production and characterization of antisera to pregnancy specific antigens in the sheep, cow and pig.
Theriogenology, 6, 627.
- STEVEN, D.H., BASS, F., JANSEN, C.J.M., KRANE, E.J., MALLON, K., SAMUEL, C.A., THOMAS, A.L. et NATHANIESZ, P.W. (1978).
Ultrastructural changes in the placenta of the ewe after fetal pituitary stalk section.
Quarterly Journal of Experimental Physiology, 63, 221-229.
- STEWART, F., ALLEN, W.R. et MOOR, R.M. (1976).
Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay.
J.Endocr., 71, 371-382.
- STOCK, R.J., JOSIMOVICH, J.B., KOSOR, B., KLOPPER, A et WILSON, G.R. (1971).
The effect of chorionic gonadotrophin and chorionic somatomammotrophin on steroidogenesis in the corpus luteum.
J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth., 78, 549-553.
- SVENSSON, H. (1961).
Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. *The differential equation of solute concentrations at a steady and its solution for simple cases.*
Acta Chem.Scand., 15, 325-341.
- TEISNER, B., GRUDZINSKAS, J.G., HINDERSSON, P., FOLKERSON, J., WESTERGAARD, J.G. et CHARD, T. (1980).
Pregnancy-specific β_1 -glycoprotein (SP₁). *Molecular heterogeneity and measurement.*
Dans: *The human placenta: proteins and hormones.* Ed. Klopffer A., Genazzani, A. et Crosignani, U.S. Edition published by Academic Press INC. 111, Fifth Avenue, New-York, 10003.

- THORELL, J.I. et JOHANSSON, B.G. (1971).
Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity.
Biochim. Biophys. Acta., 251, 363-369.
- TRAVIS, J. et PANNELL, R. (1973).
Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography.
Clin. Chim. Acta., 49, 49-52.
- TRAVIS, J. et PANNELL, R. (1974).
A method for preparing albumin-free plasma.
Behring Inst. Mitt., 54, 30-32.
- TSUSHIMA, T. et FRIESEN, H.G. (1973).
Radioreceptor assay for growth hormone.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 37, 334-337.
- TYSON, J.E., HWANG, P., GUYDA, H. et FRIESEN, H.G. (1972).
Studies of prolactin secretion in human pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol., 113, 14-20.
- VAITUKAITIS, J.L., BRAUNSTEIN, G.D. et ROSS, G.T. (1972).
A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone.
Am. J. Obstet. Gynecol., 113, 751-758.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. et ROSS, G.T. (1971).
A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 33, 988-991.
- VESTERBERG, O et SVENSSON, H. (1966).
Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV *Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins.*
Acta Chem. Scand., 20, 820-834.
- WALLIS, M. (1973).
The primary structure of bovine growth hormone.
Febs Letters, 35, n°1, 11-14.
- WALLIS, P. (1974).
The primary structure of bovine prolactin.
Febs Letters, 44, n°2, 205-208.

- WALLIS, M. (1980).
Receptors for growth hormone, prolactin, and the somatomedins dans: Cellular Receptors for hormones and Neurotransmitters. Ed. Schulster, D. et Levitzki, A. publié par Wiley, J. & Sons, Ltd.
- WATHES, D. C. et WOODING, F. B. P. (1980).
An electron microscopic study of implantation in the cow. *Am. J. Anat.*, 159, 285-306.
- WATKINS, W. B. (1978).
Use of immunocytochemical techniques for the localization of human placental lactogen. *J. Histochem. Cytochem.*, 26, 288-292.
- WEBER, K. et OSBORN, M. (1969).
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.
- WIDE, M. et WIDE, L. (1963).
Diagnosis of pregnancy in mares by an immunological method. *Nature*, 198, 1017-1018.
- WOODING, F. B. P. (1981).
Localization of ovine placental lactogen in sheep placentomes by electron microscope immunocytochemistry. *J. Reprod. Fert.*, 62, 15-19.
- WRIGLEY, C. W. (1968).
Gel electrofocusing-A technique for analysing multiple protein samples by isoelectric focusing. *Science Tools (the L.K.B. Instrument Journal)*, 15, 17-23.
- YADLEY, R. A., RODBARD, D. et CHRAMBACH, A. (1973).
Isohormones of human growth hormone. III. *Isolation by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and characterization.* *Endocrinology*, 93, 866-873.
- YOSHIMI, T., STROTT, C. A., MARSHALL, J. R. et LIPSETT, M. B. (1969).
Corpus luteum function in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29, 225-230.