

# Fractionnement et immunoréactivité de type PAG (Pregnancy-Associated Glycoprotein) des protéines extraites des caroncules maternelles chez les cervidés (*Cervus elaphus*)



Haute Ecole de la Province de Liège

Petrova A.<sup>1</sup>, Okyuma M.<sup>2</sup>, Fondja E.<sup>1</sup>, Beckers J.F.<sup>2</sup>, Sousa, N.M.<sup>2</sup>



Faculté de médecine vétérinaire

<sup>1</sup>Haute Ecole: Haute Ecole de la Province de Liège Rennequin Sualem, 6, B-4020 Liège, Belgique

<sup>2</sup>Entreprise: Physiologie de la Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg, Bd De Colonster n° 20 B41, Belgique

Stagiaire: Petrova A.

Maître de Stage: Sousa N.M.

Professeur superviseur: Mathieu A.

## ① Introduction :

Les protéines associées à la gestation (ou PAG) :

- ❖ Sont des glycoprotéines appartenant à la famille des protéases aspartiques.
- ❖ Sont exprimées par l'embryon à partir du stade de blastocyste chez les ruminants.
- ❖ Existents sous plusieurs types distincts (PAG-I, PAG-II etc.).

## ② Objectif :

- ❖ Fractionnement des protéines placentaires (caroncules) de cervidé (*Cervus elaphus*) en vue de purifier des PAGs du type 1 et/ou 2.

## ③ Matériels et Méthodes :

### a) Suivi de la purification

- ❖ Dosage des protéines totales à l'aide de la technique de Lowry.
- ❖ Dosage radioimmunologique (RIA) des PAGs.



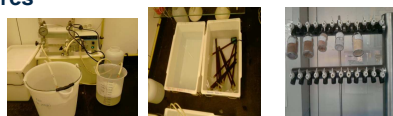
### b) Analyse des fractions obtenues

- ❖ Électrophorèse.
- ❖ Western Blot.

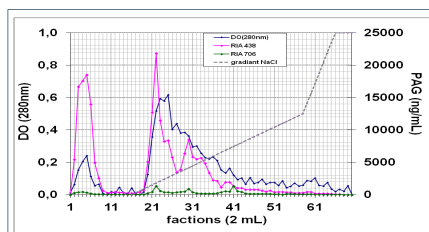


### c) Autres étapes intermédiaires

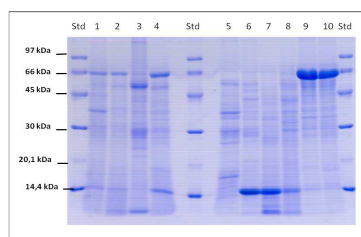
- ❖ Concentration des protéines.
- ❖ Dialyse.
- ❖ Lyophilisation.



## ④ Résultats :

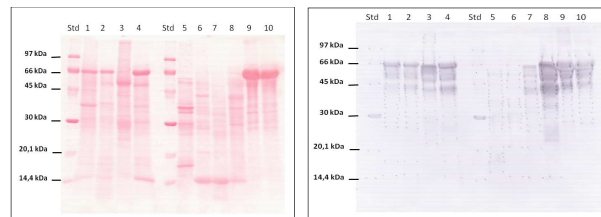


**Figure 1 :** Chromatographie sur Mono S de la fraction DEAE cellulose 0,08 M NaCl. Un total de 45 mg a été chargé. Un gradient de NaCl entre 0 et 1 M a été utilisé pour élué les protéines (à l'aide d'un FPLC).



**Figure 2A :** Visualisation des protéines après coloration au Bleu de Coomassie R250 (BC).

Coloration au Rouge Ponceau (RP) Révélation: AS#435 anti-boPAG II



**Figure 2B:** Analyse par Western Blot (AS#435) de protéines extraites des caroncules de cervidés.

Pistes: 1) Extrait brut total, 2) Précipitation acide, 3) Précipitation au sulfate d'ammonium 0-40 %, 4) Précipitation au sulfate d'ammonium 40-80 %, 5) Fraction de la DEAE sans NaCl, 6) Fraction de la DEAE contenant 0,02 M NaCl, 7) Fraction DEAE contenant 0,04 M NaCl, 8) Fraction DEAE contenant 0,08 M NaCl, 9) Fraction DEAE contenant 0,16 M NaCl, 10) Fraction DEAE contenant 0,32 M NaCl.

## d) Purification

2 kg des caroncules maternelles de *Cervus elaphus*

2 extractions consécutives de protéines (dans le tampon phosphate à pH 7,6 à 4 °C)

Précipitation acide avec l'acide phosphorique (pH 4,5 à 4 °C)

Précipitation au sulfate d'ammonium 0-40 % (4 °C) → Précipitation au sulfate d'ammonium 40-80 % (4 °C)

Chromatographie sur DEAE (cellulose DE 52 à 4 °C)

0 M NaCl 0,02 M NaCl 0,04 M NaCl 0,08 M NaCl 0,16 M NaCl 0,32 M NaCl

Chromatographie sur Mono S (FPLC)

## ⑤ Discussion des résultats :

- ❖ Par Western Blot, on a constaté qu'il existe une immunoréactivité (coloration violette lors de la révélation) de certaines protéines avec l'utilisation de l'antisérum 435 (dirigé contre les PAGs bovines de type 2).
- ❖ L'immunoréactivité à cet antisérum se localise plus particulièrement dans la fraction obtenue à partir de la DEAE éluée avec une solution contenant 0,08 M NaCl.
- ❖ La chromatographie sur DEAE n'a pas suffi pour isoler les protéines correspondantes à l'immunoreactivité décrite (présence de bandes multiples après coloration au BC et au RP).
- ❖ D'où la réalisation d'une chromatographie sur Mono S à l'aide d'un FPLC... mais elle se révéla peu efficace pour séparer les protéines recherchées (apparition de deux pics présentant une immunoréactivité de type PAG-2, dont un dans la fraction non-adsorbée).

## ⑥ Conclusion :

- ❖ Il existe une immunoréactivité de type PAG-2 dans les fractions obtenues à partir du fractionnement des protéines placentaires extraites des caroncules maternelles chez les cerfs.
- ❖ D'autres chromatographies sont en cours (Mono Q, Vicia villosa) afin d'enrichir les protéines spécifiques présentant l'immunoréactivité de type PAG-2.

## ⑦ Référence :

Sousa N.M., Ayad A., Beckers J.F., Gajewski Z. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. Journal of Physiology and Pharmacology, 2006, 57 (Suppl 8):153-171

**Remerciements :** MRW-DGARNE (Projet D31-1226), FNRS (CC1.5155.12), Fonds Spéciaux pour la Recherche ULg (Projet C11/88)