

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.¹, Okyuma M.², Fondja E.¹, Beckers J.F.², Sousa, N.M.²

¹Haute Ecole: Haute Ecole de la Province de Liège Rennequin Sualem, Quai Glosener, 6, B-4020 Liège, Belgique

²Entreprise: Physiologie de la Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg, Bd De Colombe 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.
- Existent sous plusieurs types distincts (PAG-I, PAG-II etc.).

③ Matériaux 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 :

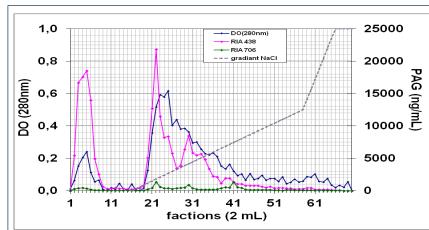


Figure 1 : Chromatographie sur Mono S de la fraction DEAE cellulose 0,08 M NaCl. Un total de 45 mg a été chargé. Un gradient de NaCl entre 0 et 1 M a été utilisé pour éluer les protéines (à l'aide d'un FPLC).

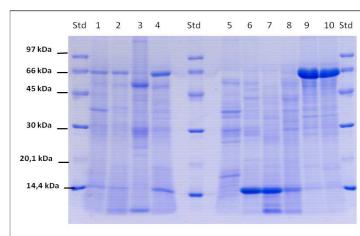


Figure 2A : Visualisation des protéines après coloration au Bleu de Coomassie R250 (BC).

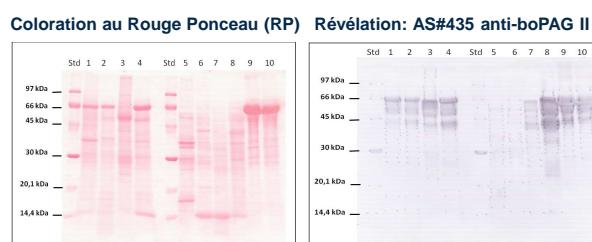


Figure 2B: Analyse par Western Blot (AS#435) de protéines extraites des caroncules de cervidés.

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.

② Objectif :

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

F
R
A
C
T
I
O
N
N
N
E
M
E
N
T

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 bovins de type 2).
- L'immunoréactivité à cet antisérum se localise plus particulièrement dans la fraction obtenue à partir de la DEAE élue 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)