

## PROTEINE ASSOCIEE A LA GESTATION OU PAG DE LAPINE. ISOLEMENT ET PURIFICATION PARTIELLE. MISE AU POINT D'UN DOSAGE RIA.

Reçu le 05/06/2001 – Accepté le 12/06/2002

### Résumé

Le placenta, zone de jonction du territoire maternel et fœtal, assure plusieurs fonctions: de protection, de nutrition et de glande. Parmi les substances produites, se trouvent les protéines associées à la gestation ou PAG, qui constituent un marqueur précoce de la gestation et un indicateur du développement fœtal. Notre étude consiste à extraire ces protéines par précipitation au sulfate d'ammonium et à les isoler par chromatographie d'échange d'ions (DEAE-cellulose), à partir de placentas de lapines. Le dosage est réalisé par quatre systèmes radio-immunologiques (RIA) hétérologues, le standard et le traceur radioactif étant la PAG bovine. Les antisera utilisés sont l'antisérum anti PAG bovine, l'anti PAG ovine et deux anti PAG caprine. La protéine que nous avons extraite, apparentée aux PAGs, reconnaît les quatre antisera avec un meilleur résultat pour l'anti PAG ovine. Cette protéine placentaire, isolée et semi-purifiée, est retrouvée essentiellement dans la fraction 0,04 M NaCl en chromatographie anionique et ce, pour les quatre systèmes RIA utilisés.

**Mots clés:** gestation, lapin, placenta, RIA, protéines-associées à la gestation.

### Abstract

The placenta, zone of junction of the maternal and foetal territories, presents several functions, like protection, nutrition and endocrine. Among the produced substances are glycoproteins associated to the pregnancy or PAG that constitute a precocious marker of the pregnancy and an indicator of the foetal development. Our study consists in extracting these proteins from placentas of rabbits by precipitation with ammonium sulphate, to isolate them by ion exchange chromatography (DEAE-cellulose). Dosages are achieved by four radio-immunological heterologous systems (RIA), with bovine PAG as standard and as radiolabeled tracer. The used antisera are the antiserum anti bovine PAG, the anti ovine PAG and two anti caprine PAG. The extracted related-protein to the PAG, recognises the four antisera with a better reaction with anti ovine PAG. This placental protein is isolated and partially purified, it is essentially recovered in the fraction 0,04 M NaCl by anion chromatography.

**Keys words:** pregnancy, rabbit, pregnancy-associated glycoprotein, RIA.

**K. OTHMANI-MECIF**

**Y. BENZAOU**

Laboratoire Matrice extracellulaire  
Faculté des Sciences Biologiques  
USTHB, BP12 El-Alia  
Bab-Ezzouar, Alger, Algérie

**J.F. BECKERS**

Laboratoire de Physiologie  
de la Reproduction  
Faculté de Médecine Vétérinaire  
Université de Liège, France

### ملخص

السخذ جهاز تواصل بين الأم و الجنين، يتميز بعدة وظائف، تغذية و حماية الجنين، فرز هرمونات و بروتينات، من بين هذه البروتينات توجد فصيلة الجليكوبروتينات المتصلة بالحمل (PAG) التي تستعمل كمؤشر مسبق للحمل التي تسمح من جهة أخرى الاطلاع على حالة الجنين. عملنا هذا يتمثل في استخراج وأستخلاص جزئي لهذه المواد من سخذ أنثى الأرنب باستعمال الأمنيوم سلفات و كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بمادة (DEAE) سيليلوز. تتم معايرة هذه البروتينات بطريقة راديومونولوجية. أربعة مضادات ضد (PAG) أستعملت؛ الأولى ضد (PAG) البقري، الثانية ضد (PAG) الظنن واثان ضد (PAG) المعز. نتيجة هذا العمل هو أن البروتينات المستخرجة من سخذ أنثى الأرنب وجدت في جزئية 0,04 M من ملح عادي (من الكروماتوغرافيا) و أن المضادات المستعملة في معايرة تفاعلت كلها مع البروتينات المستخلصة، خاصة مع المضادات ضد (PAG) الظنن.

**الكلمات المفتاحية:** الحمل- السخذ - الجليكوبروتينات- الأرنب.

Le placenta, zone d'apposition de l'endomètre et du trophoblaste, est une structure douée de diverses fonctions, le développement embryonnaire et fœtal et la production d'hormones et de protéines spécifiques. Parmi ces protéines placentaires, se trouvent les PAGs (pregnancy associated glycoproteins), qui sont synthétisées par les cellules binucléées du trophoblaste et déversées dans la circulation sanguine. Selon Roberts *et al.*[1], ces protéines joueraient un rôle dans la liaison et le transport de peptides biologiques. Leur dosage dans le sang permet le diagnostic précoce de la gestation et est un indicateur du développement fœtal [2, 3].

Les PAGs auraient un rôle dans la tolérance maternelle de la gestation en entrant en compétition avec le complexe majeur d'histocompatibilité pour la présentation de l'antigène aux cellules T. [4].

Les PAGs, qui font partie de la famille des protéases aspartiques [5], ont été isolées et caractérisées chez les ruminants [6, 7, 8] et détectées chez les équidés et les porcides [9, 10] mais non encore étudiées chez les rongeurs et le lapin.

Le but de ce travail est d'adapter un protocole expérimental pour l'extraction, pour la première fois, de PAGs placentaires de lapin, de purifier partiellement ces glycoprotéines, et de les quantifier par un dosage radio-immunologique, lequel est mis au point.

Quatre antisera anti-PAG sont testés: l'anti bovine, l'anti-ovine et deux anti-caprines, pour optimiser le système hétérologue de dosage radio-immunologique (RIA).

## MATERIELS ET TECHNIQUES

### Matériel biologique

L'expérimentation a porté sur des placentas de lapines gestantes. Le modèle d'étude est le lapin, *Cuniculus oryctolagus domesticus*, modèle courant des expérimentations biologiques et qui est particulièrement apprécié dans les études de reproduction, vu la courte durée de gestation de l'espèce (un mois) et le nombre élevé de petits par portée.

Pour réaliser cette étude, un pool de 8 placentas de lapines est constitué. Ces placentas, dont le poids total est de 460 gr., sont tous prélevés au même stade de gestation ( $J_{18}$ ; le jour  $J_0$  étant le jour de mise au mâle). Puisque la durée de gestation chez cette espèce est de un mois et que la nidation se produit entre  $J_7$  et  $J_8$ , nous avons opté pour le stade  $J_{18}$  afin d'obtenir un placenta conséquent. Après dissection des lapines, les placentas sont rapidement prélevés, rincés au NaCl à 0,9% et peuvent être conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Technique opératoire

L'évaluation des PAGs de lapine est réalisée par dosage radio-immunologique par un système hétérologue. La PAG bovine pure [6] est utilisée comme traceur radioactif et comme standard. Quatre antisera ont été testés pour le dosage de la PAG lapine, l'antisérum anti-PAG bovine (1/200000), l'anti PAG ovine, (1/20000), l'anti PAG caprine I (1/150 000) et l'anti PAG caprine II (1/40000). Ces antisera, dont les références sont b PAG 497, o PAG 495 et c PAG I 707, c PAG II 708, sont produits au laboratoire de physiologie de la reproduction de la faculté de Médecine Vétérinaire de Liège.

Le taux de protéines totales est mesuré par la technique de Lowry [11] avec la fraction V de la sérum-albumine bovine comme standard.

Le rapport molécules immuno-réactives/ protéines totales permet l'évaluation de l'activité relative de l'échantillon aux différentes étapes de l'expérimentation.

### Extraction

Les tissus placentaires sont broyés et homogénéisés avec un mixer, dans du tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{KCl}$ , 0,1M, pH 7,6) avec un rapport tampon / tissu de 5:1 (v:w). Des inhibiteurs de protéases sont ajoutés au tampon, PMSF (0,2M) et EDTA de sodium (0,2%, w:v). L'homogénéat est soumis à une agitation douce pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis à une centrifugation pendant 1h à 27 000g. Le culot éliminé, le pH du surnageant est ramené à pH 4,5 avec  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5N.

Après agitation à  $4^{\circ}\text{C}$  durant 2h, l'échantillon est centrifugé (1h à 27 000g); le culot, qui représente la sérum-albumine lapine, est éliminé, le surnageant étant réajusté à pH 7,6 avec du KOH 0.5N.

### Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium (SAS) sec est réalisée en 2 temps. Dans un premier temps, il est ajouté délicatement au surnageant récupéré, sous agitation (243 g/L). La précipitation des protéines, qui dure 4 h est suivie de centrifugation (1h à 27 000g); le culot recueilli regroupe

les protéines précipitées par saturation à 40%.

Dans un second temps, le sulfate d'ammonium est ajouté au surnageant (285 g/L) pour réaliser une solution saturée à 80% et précipiter le maximum de protéines. Cette étape est réalisée pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après centrifugation (1h à 27 000g), le culot est dissous dans du tampon Tris-HCl 0,01M pH 7,6.

Les deux culots obtenus (40% et 80% de SAS) sont dialysés contre le même tampon (Tris - HCl) pendant 36 h (6 bains de 6h) puis centrifugés pendant 30 mn à 36 000g. Des prises aliquotes sont réalisées sur les 2 échantillons; la fraction qui renferme le plus de PAGs et de protéines est soumise à l'étape suivante, à savoir la chromatographie.

### Chromatographie d'échange d'ions

La fraction 80% de sulfate d'ammonium est soumise à une chromatographie d'échange d'ions sur résine DEAE-cellulose (DE 52, Whatman) dans une colonne (20cm x 10cm). La résine est préalablement équilibrée avec du Tris-HCl 0.01M pH 7,6. Après élution des protéines non liées avec du tampon seul, les protéines fixées à la résine sont détachées par augmentation de la force ionique du tampon avec du NaCl (0,02M ; 0,04M ; 0,06M ; 0,08M et 0,1M); six étapes sont ainsi réalisées (étapes 0 à 5).

Les éluats, largement dialysés contre le même tampon sans NaCl, sont dosés avec les quatre systèmes hétérologues. Les échantillons des différentes étapes sont lyophilisés et conservés à  $-30^{\circ}\text{C}$  en vue de tests ultérieurs.

## RESULTATS

Les protéines immunoréactives sont retrouvées dans les fractions 40% et 80% de sulfate d'ammonium, de façon importante dans la fraction 80% pour les systèmes RIA avec antisera anti-caprins (Tab. 1 et 2) alors que pour les RIA avec antisera anti-bovin et anti-ovin, c'est la fraction 40% qui semble plus riche en PAG ( $1,10 \cdot 10^{-4}$  et  $1,81 \cdot 10^{-4}$ ) (Tab. 3 et 4).

Par chromatographie d'échange d'ions avec gradient croissant de NaCl, nos résultats montrent que la plus grande proportion de PAG est retenue par la résine anionique (96 % et ce, pour les 4 antisera testés), ce qui laisse supposer que la substance étudiée serait sous forme anionique au pH de l'expérimentation (pH 7,6).

D'autre part, il semble que par la technique chromatographique, l'élution en présence de 0,04M de NaCl (l'étape 3 DEAE) libère la fraction la plus riche en substance immuno-réactive reconnue par les quatre antisera (Tab. 5, Fig. 5).

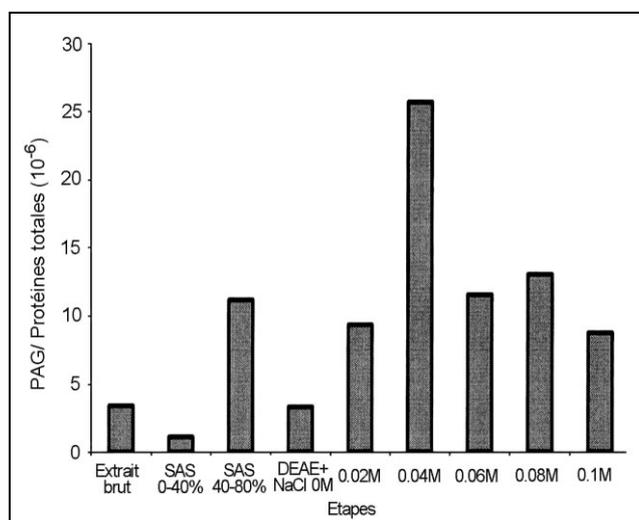
En comparant les 4 systèmes RIA utilisés, nous déduisons que c'est l'antisérum anti-ovin qui détecte relativement le mieux la PAG lapine (Tab. 6, Fig. 6), c'est ainsi que le rapport PAG/ protéines totales de l'étape 3 est de  $102,8 \cdot 10^{-6}$  pour l'anti-ovin contre  $82 \cdot 10^{-6}$ ,  $25,7 \cdot 10^{-6}$ ,  $54,28 \cdot 10^{-6}$  pour l'anti-bovin, l'anti-caprin I et l'anti-caprin II respectivement (Tab. 5, Fig. 5).

## DISCUSSION

La littérature ne mentionnant aucun travail sur les PAGs de lapine, il nous a paru intéressant, compte tenu des

Paramètres Etapas	Protéines totale (mg)	PAG ( $\mu$ g)	PAG/Protéines totales $\times 10^{-6}$
Extrait brut	23000	78	3,39
SAS 0-40%	187	0,21	1,12
SAS 40-80%	8244	92	11,15
DEAE + NaCl 0 M	6030	20	3,31
0,02 M	387	3,6	9,30
0,04 M	350	9	25,7
0,06 M	468	5,4	11,53
0,08 M	291	3,8	13,05
0,10 M	320	2,8	8,75

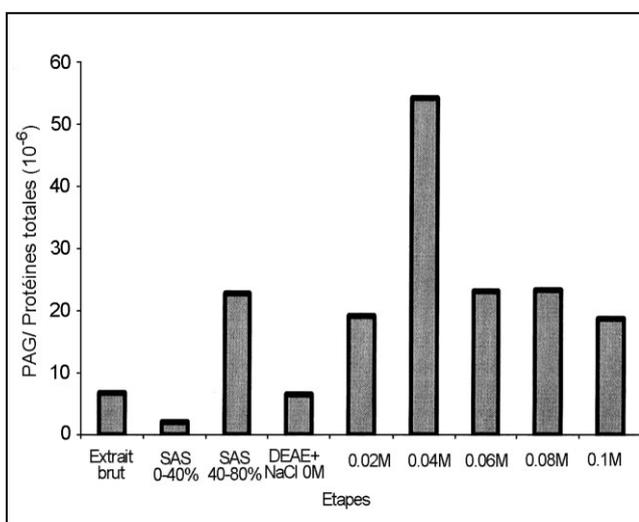
**Tableau 1:** Quantification de la PAG par RIA avec antisérum anti c PAG I.



**Figure 1:** Evaluation du taux de PAG/ protéines totales par RIA avec anti c PAG I.

Paramètres Etapas	Protéines totales (mg)	PAG ( $\mu$ g)	PAG/Protéines totales $\times 10^{-6}$
Extrait brut	23000	158	6,84
SAS 0-40%	187	0,4	2,13
SAS 40-80%	8244	187	22,68
DEAE + NaCl 0 M	6030	39	6,46
0,02 M	387	7,4	19,12
0,04 M	350	19	54,28
0,06 M	468	10,8	23,07
0,08 M	291	6,8	23,36
0,10 M	320	6	18,75

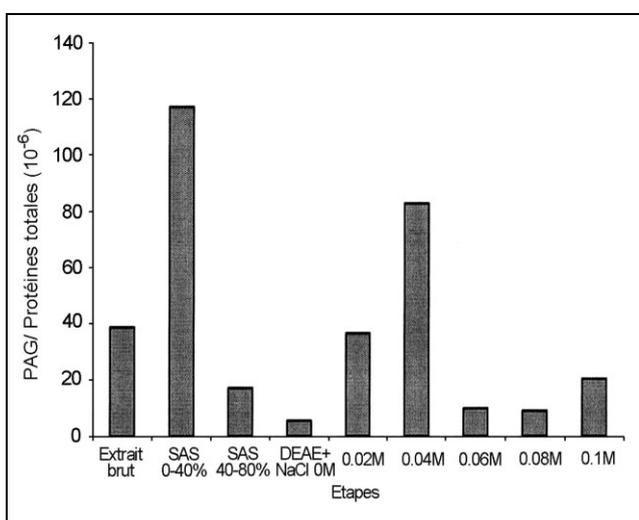
**Tableau 2:** Quantification de la PAG par RIA avec antisérum anti c PAG II.



**Figure 2:** Evaluation du taux de PAG/ protéines totales par RIA avec anti c PAG II.

Paramètres Etapas	Protéines totales (mg)	PAG ( $\mu$ g)	PAG/Protéines totales $\times 10^{-6}$
Extrait brut	23000	892	38,78
SAS 0-40%	187	22	117
SAS 40-80%	8244	141	17,1
DEAE + NaCl 0 M	6030	32	5,3
0,02 M	387	14,2	36,6
0,04 M	350	29	82,8
0,06 M	468	4,6	9,82
0,08 M	291	2,6	8,93
0,10 M	320	6,5	20,3

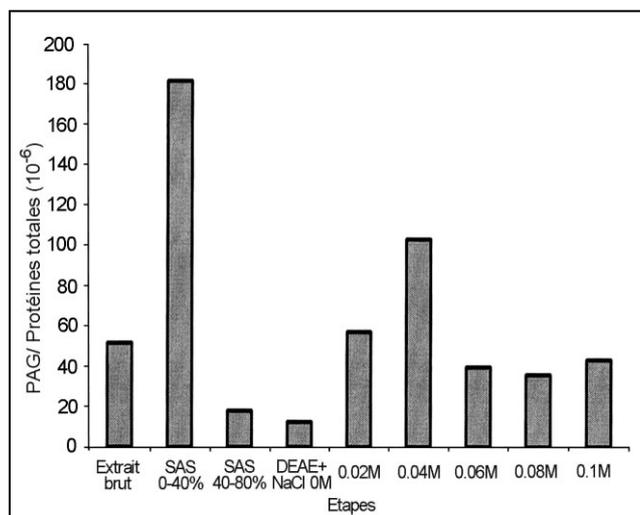
**Tableau 3:** Quantification de la PAG par RIA avec antisérum anti b PAG.



**Figure 3:** Evaluation du rapport PAG/ protéines totales par RIA avec anti b PAG.

Paramètres Etapas	Protéines totales (mg)	PAG ( $\mu$ g)	PAG/Protéines totales $\times 10^{-6}$
Extrait brut	23000	1187	51,6
SAS 0-40%	187	34	181
SAS 40-80%	8244	147	17,8
DEAE + NaCl 0 M	6030	75	12,4
0,02 M	387	22	56,8
0,04 M	350	36	102,8
0,06 M	468	18,4	39,3
0,08 M	291	10,6	36
0,10 M	320	14	43

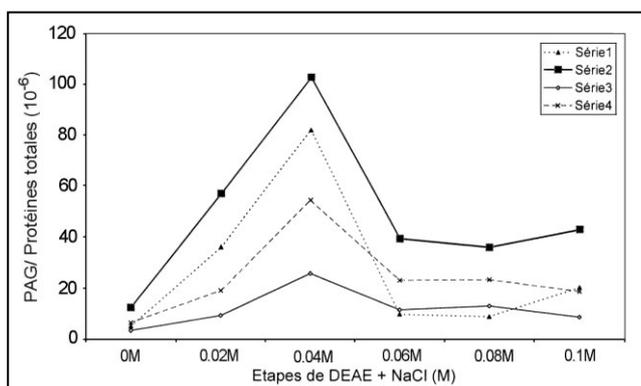
**Tableau 4:** Quantification de la PAG par RIA avec antisérum anti o PAG.



**Figure 4:** Evaluation du rapport de PAG/ protéines totales par RIA avec anti o PAG.

Antisera Etapas	Anti b PAG $\times 10^{-6}$	Anti o PAG $\times 10^{-6}$	Anti c PAG I $\times 10^{-6}$	Anti c PAG II $\times 10^{-6}$
DEAE+NaCl 0 M	5	12,4	3,31	6,46
0,02 M	36	56,8	9,30	19,12
<b>0,04 M</b>	<b>82</b>	<b>102,8</b>	<b>25,7</b>	<b>54,28</b>
0,06 M	9,8	39,3	11,53	23,07
0,08 M	8,9	36	13,05	23,36
0,10 M	20,3	43	8,75	18,75

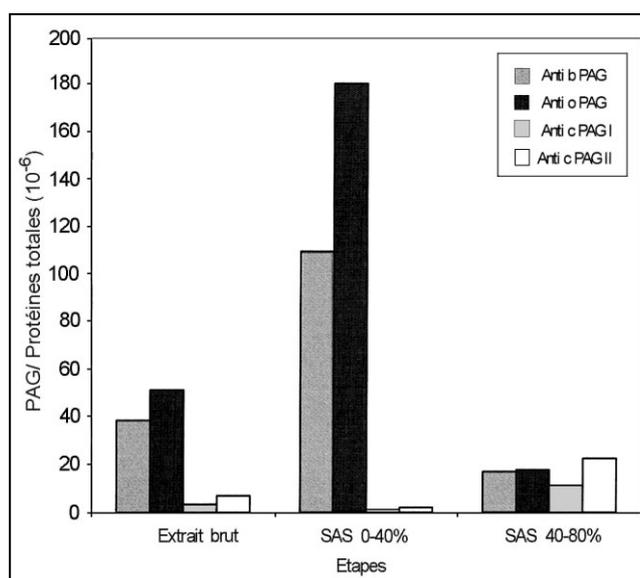
**Tableau 5:** Rapports PAG/ Protéines totales des fractions chromatographiques avec les quatre systèmes RIA.



**Figure 5:** Rapports PAG/ Protéines totales dans les fractions chromatographiques avec les quatre antisera utilisés.

Antisera Etapas	Anti b PAG	Anti o PAG	Anti c PAG I	Anti c PAG II
Extrait brut	38,78	51,6	3,39	6,86
SAS 0-40%	110	181	1,12	2,13
SAS 40-80%	17	17,8	11,15	22,68

**Tableau 6:** Rapports PAG / Protéines totales avec les quatre systèmes RIA.



**Figure 6:** Rapports PAG/ Protéines totales selon les quatre systèmes RIA.

caractéristiques de cette espèce, de réaliser l'extraction et l'isolement de protéines de cette famille à partir de placentas de lapines.

Le protocole expérimental utilisé est basé sur la technique de Zoli *et al.*[6] modifiée. Les dosages radio-immunologiques utilisés sur des échantillons de différentes étapes ont mis en évidence des molécules antigéniques reconnues par les quatre antisera dirigés contre les PAGs, bovine, ovine et caprines. Ces PAGs, qui sont des glycoprotéines de la famille des protéases aspartiques [5, 1]

sans activité enzymatique [12], présentent des similarités de séquence entre elles.

Notre étude montre que, lors de la gestation, le placenta de lapine produit une ou des formes glycoprotéique(s) analogue(s) aux PAGs isolées des ruminants domestiques.

Quel que soit le type d'antisérum utilisé dans nos dosages radio-immunologiques, il semble que la PAG de lapine se lie quantitativement à la résine DEAE-cellulose à pH 7,6, indiquant une nature non basique de la protéine. Cette protéine est éluée essentiellement à 0,04M de NaCl, alors que la PAG bovine, recueillie entre 0,04M et 0,2M, a présenté un maximum à 0,08M de NaCl [6]; l'ovine [13] et la caprine [7] ont été obtenues à 0,04M et 0,08M de NaCl. Ces différences sont interprétées par la coexistence de plusieurs isoformes [14] qui diffèrent par leur degré de glycosylation et leurs groupements sialiques.

### CONCLUSION

Notre étude montre que lors de la gestation, le placenta de lapine produit une ou des formes glycoprotéique(s) analogue(s) aux PAGs isolées des ruminants domestiques. A un stade plus précoce de la gestation, ces glycoprotéines sont retrouvées à un taux plus élevé [15]. Ainsi, au stade J<sub>14</sub> le taux relatif de ces PAGs est trouvé plus élevé qu'aux stades J<sub>18</sub> et J<sub>21</sub>, ce qui suggère un rôle particulier de ces glycoprotéines dans le processus de remaniements de l'endomètre au cours de la gestation.

### REFERENCES

- [1]- Roberts R.M., Xie S., Nagel R.J., Low B.G., Green J., Beckers J.F., "Glycoproteins of the aspartyl proteinase gene family secreted by the developing placenta", In: Takahashi K. (ed.), Aspartic proteinase: structure, function, biology and biomedical implications. Tokyo: Plenum Press, (1995), pp. 231-240.
- [2]- Humblot P., Courtin H., Jeanguyot N., Thibier M., Sasser R.G., "Pregnancy specific protein B and oestrone sulfate concentrations during pregnancy and embryonic mortality in dairy goats", 12<sup>th</sup> International congress on animal reproduction. The Hague, Netherlands. August 23-27, (1992), p.2.
- [3]- Patel O.V., Hirako M., Takahashi T., Sasaki N., Domeki I., "Plasma bovine placental lactogen concentration throughout pregnancy in the cow; relationship to stage of pregnancy, fetal mass, number and postpartum milk yield", *Domestic Anim. Endocr.*, 13, (1996), pp. 351-359.
- [4]- Robert R.M., Xie S., Mathialagan N., "Maternal recognition of pregnancy", *Biol. Reprod.*, 54, (1996), pp. 294-302.
- [5]- Xie S., Low B.G., Nagel R.J., Kramer K.K., Anthony R.V., Zoli A.P., Beckers J.F., Roberts R.M., "Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, (1991), pp. 10247-10251.
- [6]- Zoli A.P., Beckers J.F., Wouters-Ballman P., Closset J., Falmagne P., Ectors F., "Purification and characterisation of a bovine pregnancy-associated glycoprotein", *Biol. Reprod.*, 45, (1991), pp. 1-10.
- [7]- Garbayo J.M., Rémy B., Alabart J.L., Folch J., Wattiez R., Falmagne P., Beckers J.F., "Isolation and partial characterisation of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta", *Biol. Reprod.*, 58, (1998), pp. 109-115.
- [8]- Green J., Xie S., Quan X., Bao B., Gan X., Mathialagan N., Beckers J.F., Roberts R.M., "Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy", *Biol. Reprod.*, 62, (2000), pp. 1624-1631.
- [9]- Xie S., Newman A., Szafranska B., Roberts R.M., Baker C.B., McDowell K., Green J.A., "Pregnancy-associated glycoproteins of the horse", *Biol. Reprod.*, 50(suppl.1), (1994), abst.152.
- [10]- Szafranska B., Xie S., Green J., Roberts R.M., "Porcine pregnancy associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophoblast", *Biol. Reprod.*, 53, (1995), pp. 21-28.
- [11]- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.G., "Protein measurement with the folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193, (1951), 265-275.
- [12]- Guruprasad K., Blundell T.L., Xie S., Green J., Szafranska B., Nagel R.J., McDowell K., Baker C.B., Roberts R.M., "Comparative modelling and analysis of amino acid substitutions suggests that the family of pregnancy – associated glycoproteins includes both active and inactive aspartic proteinases", *Protein Eng.*, 50, (1996), pp. 684-687.
- [13]- Zoli A.P., Beckers J.F., Ectors F., "Isolement et caractérisation partielle d'une glycoprotéine associée à la gestation chez la brebis", *Ann. Med.Vet.*, 139, (1995), pp. 177-184.
- [14]- Xie S., Green J., Beckers J.F., Roberts R.M., "The gene encoding bovine pregnancy – associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family", *Gene*, 159, (1995), pp. 193-197.
- [15]- Othmani- Mecif K., Benazzoug Y., Rémy B., Beckers J.F., "Partial purification of rabbit placental PAG (Pregnancy Associated Glycoprotein)", 69<sup>ème</sup> Congress Soc. Physiol., 5-7 Sept. (2001), Montpellier. □