

# THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

## Résumé

**Orientation :** Santé et Productions Animales

**Titre de la thèse en français :**

Investigations sur les glycoprotéines-associées à la gestation (PAGs) chez la brebis : isolement, purification et caractérisation

**Titre de la thèse en anglais :**

Investigations on Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAGs) in sheep: isolation, purification and characterization

**Candidat :** Bouchra El Amiri

**Promoteur :** Prof. J. F. Beckers

**Co-promoteur :** Dr. J. L. Hornick

**Département et Service :** Sciences fonctionnelles, secteur de Physiologie de la Reproduction Animale

**Date de la défense publique :** le 10 avril 2003

**Composition du Jury :** P. Lekeux, B. Joris, Y. Cognié, G. Maghuin, J.-L. Hornick, P. Gustin, F. Rollin, J. Closset, L. Grobet, F. Bureau, J.-F. Beckers

### DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Intitulée : « Investigations sur les Glycoprotéines-Associées à la Gestation (PAGs) chez la brebis: Isolement, purification et caractérisation », cette thèse entre dans la famille des travaux portant sur l'étude des protéines placentaires chez les artiodactyles et plus précisément chez les ruminants. Onze nouvelles molécules de PAGs ont été identifiées à partir d'extraits de cotylédons fœtaux.

Le présent travail apporte des informations nouvelles sur le dosage des PAGs dans le lait de la brebis gestante et ouvre la possibilité d'utiliser ce liquide biologique pour établir le diagnostic de la gestation chez les ovins laitiers.

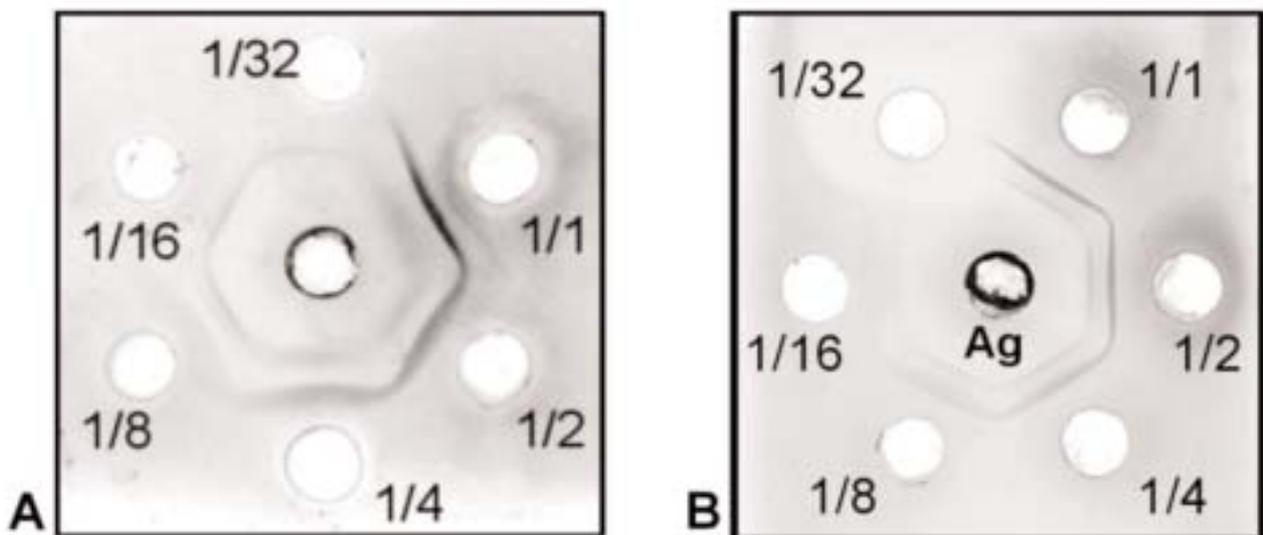
### RÉSULTATS

Dans la première partie du présent travail, une approche immunologique a été utilisée pour détecter les PAGs dans des extraits bruts de placentas de ruminants et de non-ruminants. Des réactions de deux types ont été observées. Chez les non-ruminants (à l'exception du lapin), les extraits contiennent une seule protéine apparentée à la boPAG2 alors que chez les ruminants, une multitude de réactions a été observée. La brebis a montré plusieurs lignes de précipitations quel que soit l'antisérum utilisé.

Une approche biochimique a été utilisée pour caractériser les PAGs isolées à partir de cotylédons fœtaux provenant

de gestations tardives ( $\geq 100$  jours de gestation) et de gestations précoces (60 à 100 jours de gestation). Les différentes étapes impliquaient des précipitations acides et au sulfate d'ammonium et des chromatographies par échange d'anions et de cations. Plusieurs dosages radioimmunologiques ont été utilisés pour suivre l'immunoréactivité des fractions aux cours des différentes étapes de purification. Les fractions les plus immunoréactives issues des chromatographies par échange d'ions ont été analysées par électrophorèse en SDS et Western Blot avant le transfert sur une membrane de *polyvinylidene difluoride* (PVDF) pour microséquençage de la partie N-terminale. Différentes isoformes de PAGs présentant des masses moléculaires apparentes allant de 55 à 66 kDa et des points isoélectriques compris entre 4 et 6,8 ont été identifiés. Le microséquençage de la partie N-terminale (10 à 25 acides aminés) a permis d'identifier 11 molécules différentes. La recherche dans les banques de protéines et de nucléotides a révélé que parmi ces 11 molécules, 4 correspondaient à des molécules dont le DNA complémentaire avait déjà été défini. Les autres séquences ne correspondaient à aucune molécule identifiée jusqu'à présent et de ce fait, elles ont été considérées comme nouvelles.

Dans la troisième partie, réalisée en collaboration avec des chercheurs de l'INRA de Nouzilly (Tours, France), deux dosages radioimmunologiques homologues ont été développés et validés. Ces dosages ont été utilisés pour détecter des glycoprotéines associées à la gestation dans le sang et



Double immunodiffusion radiale réalisée sur des extraits de placentas prélevés en début (30-40 j) et en milieu (70 j) de gestation.  
El Amiri *et al.*, *Theriogenology*, 59, 2003, 1291-1301

dans le lait chez les ovins de race Lacaune ( $n = 20$ ). Le lait était collecté avec ou sans agent de conservation (bichromate de potassium). Les échantillons étaient prélevés à différents jours (1, 18, 20, 22, 25, 28, 32, 35, 45 et 49) après insémination artificielle.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail permet d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la gestion de la reproduction des troupeaux. Désormais, les systèmes disponibles permettent d'une part d'établir des profils de PAGs au cours de la gestation et d'autre part de déterminer dans quelle mesure ces systèmes peuvent être utilisés dans le diagnostic prédictif de la viabilité embryonnaire et fœtale.

En conclusion, notre étude a permis d'isoler et de caractériser de nouvelles molécules de la famille des protéines associées à la gestation. Deux nouveaux dosages homologues sont mis en place. Leur utilisation dans le diagnostic précoce de la gestation a été vérifiée aussi bien dans le plasma que dans le lait.

## REMERCIEMENTS

Cette recherche a été possible grâce au soutien financier de l'AGCD/TCB, de l'INRA de Nouzilly (France), de l'INRA-Maroc, du FNRS et du Ministère de l'Agriculture Belge.

---

## PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

EL AMIRI B., MELO DE SOUSA N., MECIF K., DESBULEUX H., BANGA-MBOKO H., BECKERS J.F. Double radial immunodiffusion as tool to identify pregnancy-associated glycoproteins in ruminant and nonruminant placentae. *Theriogenology*, 2003, **59**, 1291-1301.

EL AMIRI B., REMY B., MELO DE SOUSA N., JORIS B., GERARDIN-OTTIERS N., PERENYI Z., BANGA-MBOKO H., BECKERS J.F. Isolation and partial characterization of three pregnancy-associated glycoproteins from the ewe placenta. *Mol. Reprod. Dev.*, 2003, **64**, 199-206.

EL AMIRI B., KAREN A., COGNIÉ Y., MELO DE SOUSA N., HORNICK J.L., SZENCI O., BECKERS J.F. Diagnostic et suivi de gestation chez la brebis: réalités et perspectives. *Prod. Anim.*, 2006, **16**, 79-90.

EL AMIRI B., REMY B., MELO DE SOUSA N., BECKERS J.F. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between Day 60 and Day 100 of gestation. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2004, **44**, 1-13.