

Université de Montréal

L'oviductine de hamster: clonage de l'ADNc, séquence protéique
déduite et structure du gène

par

Yannick Merlen

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en biochimie

décembre 2000

© Yannick Merlen, 2000



W
4
U58
2001
v. 038

(Université de Montréal)

Université de Montréal, chargé de l'ADN, séquence protéique
déchiffrée et structurée au génome

Yves-Marie
Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Spécialiste Doctor (Ph.D.) en biochimie

décembre 2000

© Université de Montréal 2001



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

cette thèse intitulée:

L'oviductine de hamster: clonage de l'ADNc, séquence protéique
déduite et structure du gène

présentée par:

Yannick Merlen

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dre Sylvie Mader
Dr Gilles Bleau
Dr Luc Desgroseillers
Dr Robert Sullivan
Dr David Silverside

présidente du jury
directeur de recherche
membre du jury
examineur externe
représentant du doyen

thèse acceptée le: 22 mars 2001

Sommaire

L'oviductine de hamster est une glycoprotéine de masse moléculaire apparente de 160-210 kDa exprimée exclusivement par les cellules sécrétrices de l'épithélium de l'oviducte, et sécrétée dans le fluide tubaire. Sa synthèse est stimulée par les œstrogènes, et on la détecte en quantité maximale à la période périovulatoire. La principale caractéristique de cette glycoprotéine est de pouvoir s'associer de façon spécifique à la zone pellucide (ZP) de l'ovocyte et de l'embryon tubaire, mais son rôle biologique est encore inconnu. Le but de cette étude était d'obtenir la séquence peptidique de l'oviductine de hamster doré par l'entremise de la séquence de son ADN complémentaire (ADNc), et d'élucider la structure du gène l'encodant, afin d'accumuler le plus d'indices possible quant à son rôle biologique. L'obtention de l'ADNc par une combinaison d'amplification par PCR et de criblage de banque d'ADNc d'oviducte de hamster a permis d'établir que la protéine mature sécrétée est composée de 635 acides aminés (a.a.) et a une masse moléculaire de 69358 Da, indiquant que la protéine mature doit plus de 50% de sa masse moléculaire aux groupements O-glycosylés. Dans sa partie amino-terminale, l'oviductine démontre une similitude de séquence élevée avec la famille 18 des glycosyle hydrolases, aussi appelées chitinases, ainsi qu'avec un groupe grandissant de protéines apparentées aux chitinases (PACs), de rôle biologique inconnu. L'oviductine et les PACs ne possèdent toutefois pas d'activité chitinolytique. Dans sa partie carboxy-terminale, l'oviductine comprend six répétitions en tandem de 15 a.a. riches en résidus proline (P), thréonine (T) et sérine (S). L'existence d'un

polymorphisme allélique, dû à un nombre variable de répétitions en tandem, est confirmé par l'existence de deux formes majeures possédant 6 et 7 répétitions. Cette particularité, de même que la présence des répétitions riches en P, T et S et d'une très importante O-glycosylation, permet de classer l'oviductine comme une mucine épithéliale. Le gène encodant l'oviductine de hamster a été isolé par amplification par PCR sur ADN génomique. On remarque, entre autre, dans la région 5' flanquante proximale, une boîte TATA non-consensus ($-33\text{TAT}\underline{\text{I}}\text{AA}-28$), l'absence d'une boîte CAAT, et un élément de réponse aux œstrogènes ($-107\text{GGTCACTGTGAC}\underline{\text{I}}-95$) presque parfait. La région 5' non-traduite de 14 nucléotides est particulièrement courte. La séquence codante du gène de l'oviductine de hamster est distribuée en 11 exons, dont le dernier à lui seul contient 50% de la séquence codante et l'ensemble de la région encodant les répétitions en tandem. Un rôle de protection de l'embryon/ovocyte tubaires et d'aiguillage de l'implantation vers l'utérus est suggéré. La similitude de séquence avec les chitinases serait responsable de la liaison de l'oviductine avec la ZP, tandis que les caractéristiques communes aux mucines confèreraient à l'oviductine son rôle protecteur et antiadhésif.

Table des matières

	page
page titre	i
identification du jury	ii
sommaire	iii-iv
table des matières	vi-xi
liste des tableaux	xiii
liste des figures	xiv-xv
liste des abréviations et sigles utilisés	xvi-xix
dédicace	xx
remerciements	xxi

1.Introduction	1
1.1- L'oviducte	1
1.1.1- Historique	
1.1.2- Rôles dans la fécondation, origine embryonnaire et description anatomique de l'oviducte	2
1.2- L'effet des œstrogènes sur l'oviducte	7
1.2.1- L'effet des œstrogènes sur les cellules sécrétrices	7
1.2.2- L'effet des œstrogènes sur les cellules ciliées	9
1.2.3 L'effet des œstrogènes sur l'ensemble de l'oviducte	10
1.3- Composition du fluide tubaire	10
1.3.1- Transsudation à partir du sérum sanguin	11
1.3.2- Sécrétions de l'épithélium tubaire	12
1.4 Identification de protéines spécifiques à l'oviducte	12
1.4.1- L'oviductine de hamster	14
1.4.2- Rôles biologiques proposés de l'oviductine	18
1.5- Les Mucines	21
1.5.1- Définition	21
1.5.2- Types de mucines	22
1.5.2.1- Mucines épithéliales vs mucine endothéliales et leucocytaires	22

1.5.2.2-	Mucines sécrétées vs mucines associées à la membrane	23
1.5.3-	Caractéristiques des mucines épithéliales	24
1.5.4-	Propriétés physico-chimiques des mucines	25
1.5.5-	Saccharides retrouvés chez les mucines	26
1.5.6-	Mucines épithéliales du tractus génital de la femelle	26
1.6-	Les chitinases	27
1.7-	Les protéines apparentées aux chitinases (PAC)	28
1.8-	Le cycle ovarien de la femelle	29
1.8.1-	L'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien	29
1.8.2-	Le cycle ovulatoire	31
2.	Objectifs de recherche	34
3.	Matériel et méthodes	35
3.1-	Isolement de l'ADNc de l'oviductine de hamster	35
3.1.1-	Oligonucléotides	35
3.1.2-	Synthèse de l'ADNc	35

3.1.3- Isolement d'une sonde d'ADNc spécifique à l'oviductine	36
3.1.4- Isolement de bactériophages contenant des clones d'ADNc d'oviductine	37
3.1.5- PCR	38
3.1.6- Séquençage et analyse de séquence	39
3.1.7- Analyse des ARN	40
3.1.8- Isolement d'ADN génomique de hamster	41
3.1.9- Polymorphisme allélique	42
3.2- Isolement du gène de l'oviductine de hamster	43
3.2.1- Oligonucléotides	43
3.2.2- Isolement d'ADN génomique de hamster	43
3.2.3- Estimation de la taille du gène	44
3.2.4- Isolement de la partie 5' flanquante	45
3.2.4.1- ETCL-PCR	45
3.2.4.2- Préparation de l'ADN génomique	45
3.2.4.3- Assemblage de la cassette	46
3.2.4.4- Ligation des fragments de restriction produits par AvrII à la cassette MCO/AC2J	46
3.2.4.5- Amplification par PCR	48
3.2.4.6- XLPCR	50
3.2.5- Isolement du pendant génomique de l'oviductine de hamster	51
3.2.6- Séquençage et analyse de séquence	52
3.2.7- Détermination du site d'initiation de la transcription	52

3.2.8- Plasmides et sondes	53
3.2.9- Buvardage de Southern et hybridation	54

4.Résultats **55**

4.1- Caractérisation de l'ADNc de l'oviductine de hamster **55**

4.1.1- Clonage et séquençage de l'ADNc	55
--	----

4.1.2- Analyse de la séquence de l'ADNc et de la séquence peptidique déduite	58
--	----

4.1.3- Recherche de protéines similaires dans les banques de données	61
--	----

4.1.3.1- Homologues de l'oviductine de hamster	61
--	----

4.1.3.2- Chitinases et protéines apparentées aux chitinases	66
---	----

4.1.4- Polymorphisme allélique du gène de hamster	68
---	----

4.1.4.1 Détermination du nombre de copie du gène	71
--	----

4.1.5- Expression tissulaire de l'oviductine de hamster	71
---	----

4.2- Caractérisation du gène de l'oviductine de hamster **74**

4.2.1- Estimation de la taille du gène de l'oviductine de hamster	74
---	----

4.2.2- Clonage et séquençage de la partie 5' flanquante	74
4.2.3- Détermination du site d'initiation de la transcription	80
4.2.4- Caractérisation de la structure du gène	82
4.2.5- Comparaison de la structure du gène de l'oviductine de hamster	85
5.Discussion	87
5.1- Analyse des séquences nucléotidique et peptidique de l'oviductine de hamster	87
5.1.1- Séquence nucléotidique	87
5.1.2- Séquence peptidique déduite	88
5.2- Recherche de protéines similaires dans les banques de données	90
5.2.1- Les oviductines homologues	90
5.2.2- Les chitinases	91
5.2.3- Les protéines apparentées aux chitinases	93
5.3- Polymorphisme allélique du gène de l'oviductine de hamster	96
5.4- Analyse de l'expression de l'ARNm de l'oviductine	98
5.5- Analyse de la région 5' flanquante	101

5.6- Analyse de la structure du gène	107
5.7- Hypothèses sur le(s) rôle(s) biologique(s) de l'oviductine	109
5.7.1- Protection de l'ovocyte/embryon tubaire et aiguillage de l'implantation de l'implantation vers l'utérus	109
5.7.2- Association de l'oviductine à la surface du spermatozoïde	112
5.7.3- Inhibition du système immunitaire maternel dans l'oviducte	115
5.7.4- Sélection des spermatozoïdes et blocage de l'isthme	117
5.7.5- Contrôle de la division embryonnaire	118
5.8- Culture d'ovocytes/embryons en présence de facteurs tubaires	121
6.Conclusions et perspectives	123
7.Bibliographie	126
8.Annexes	155

8.1	amorces utilisées dans ce travail	156
8.2	conditions des principales amplifications par PCR	158

Liste des tableaux

		page
Tableau I:	Comparaison des ADNc des diverses oviductines, ainsi que de la taille du messenger et du peptide déduit.	62
Tableau II:	Comparaison d'éléments retrouvés à proximité du site d'initiation de la transcription de l'oviductine de hamster et ses homologues humain (OGP) et murin (Ogp).	82
Tableau III:	Jonctions Exon/Intron du gène de l'oviductine de hamster	83

Liste des figures

		page
fig. 1:	Représentation schématique du tractus génital féminin, tel qu'il serait exposé par une coupe frontale.	6
fig. 2:	Résumé de la technique d'ETCL-PCR d'Iwahana et coll. (1994).	47
fig. 3:	Clonage de l'ADNc de l'oviductine de hamster.	57
fig. 4:	Séquence peptidique déduite de l'ADNc de l'oviductine de hamster.	60
fig. 5:	Alignement des séquences peptidiques des diverses oviductines.	63-65
fig. 6:	Alignement des séquences peptidiques des oviductines, de protéines apparentées aux chitinases (PAC) et de quelques chitinases.	67
fig. 7:	Polymorphisme allélique du gène de l'oviductine de hamster.	70

fig. 8:	Détermination du nombre de copie du gène de l'oviductine de hamster.	72
fig. 9:	Expression tissulaire de l'oviductine de hamster.	73
fig. 10:	Estimation de la taille du gène de l'oviductine de hamster	77
fig. 11:	Séquence de la région 5' flanquante du gène de l'oviductine de hamster	78
fig. 12:	Représentation schématique de la région 5' flanquante du gène de l'oviductine de hamster	79
fig. 13:	Détermination du site d'initiation de la transcription du gène de l'oviductine de hamster	81
fig. 14:	Représentation schématique de la structure du gène de l'oviductine de hamster	83
fig. 15:	Comparaison du nombre et de la taille des exons de gènes encodant des oviductines et des PACs.	86

Liste des sigles et abréviations utilisés

3' NT:	partie 3' non-traduite
5' NT:	partie 5' non-traduite
³² P:	radio-isotope 32 du phosphore
³⁵ S:	radio-isotope 35 du soufre
A:	adénine
a.a.:	acide aminé
ADN:	acide désoxyribonucléique
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
ASGP:	<i>Ascite Sialoglycoprotein</i>
C:	cytidine
Ca.a.:	cystéine
CLO:	cadre de lecture ouvert (<i>Open Reading Frame</i>)
CPM:	compte par minute
D:	jour (<i>diem</i>)
Da:	Dalton
dCTP:	désoxycytidine triphosphate
DMEM:	milieu de culture Eagle modifié de Dulbecco
d(T):	déoxythymidine
E ₂ :	17β-œstradiol
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	acide éthylènediaminetétraacétique
ER:	récepteur des œstrogènes
ERE:	élément de réponse aux œstrogènes
ETCL-PCR:	<i>Enzyme-trimmed cassette ligation PCR</i>

FBS:	sérum de veau foetal
FIV:	fécondation <i>in vitro</i>
FSH:	hormone folliculo-stimulante
GnRH:	gonadostimuline
h:	heure
hCG:	hormone choriogonadotropine humaine
HC gp-39:	<i>human cartilage glycoprotein-39</i>
HMPCR:	<i>Hail Mary PCR</i>
Ig:	immunoglobuline
kb:	kilobase
kDa:	kiloDalton
LH:	hormone lutéinisante
µg:	microgramme
µL:	microlitre
µM:	micromolaire
mg:	milligramme
mL:	millilitre
mM:	millimolaire
min.:	minute
MUC:	protéine de la famille des mucines épithéliales humaine
mUI:	milliunité internationale
NaCl:	chlorure de sodium
NaPP:	pyrophosphate de sodium
ng:	nanogramme
nm:	nanomole
nt:	nucléotide
NVRT:	nombre variable de répétitions en tandem

Ogp:	<i>mouse oviductal glycoprotein</i> ; oviductine murine
OGP:	<i>human oviductal glycoprotein</i> ; oviductine humaine
oligo:	oligonucléotide
P:	proline
P4:	progestérone
PAC:	protéine apparentée aux chitinases
pb:	paire de base
PBS:	solution saline tamponnée au phosphate
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
pm:	picomolaire
RT-PCR:	transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne
s:	seconde
S:	sérine; unitéSvedberg
SDS:	dodécyle sulfate de sodium
SDS-PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium
SMC:	<i>sialomucin complex</i> ; MUC4
SSC:	solution de chlorure de sodium et citrate de sodium
STE:	solution de chlorure de sodium, tris et EDTA
T:	thréonine
T (°C):	température
T _m :	température de fusion
Tris:	2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3 propanediol
UWGCG:	<i>University of Wisconsin Genetic Computer Group</i>
XLPCR:	<i>Extra-long PCR</i> ; PCR avec temps de synthèse allongé

- YKL-39: famille de protéines apparentées aux chitinases, de masse relative de 39000
- YKL-40: famille de protéines apparentées aux chitinases, de masse relative de 40000
- Ym1: protéine apparentée aux chitinases sécrétée par les macrophages activés murins

*Je dédie cette thèse à mon frère , ma
mère et mon père, en particulier, ainsi
qu'aux membres de ma famille des deux
côtés de l'Atlantique.*

Remerciements

J'aimerais remercier, avant tous, le Dr Gilles Bleau, sans qui je n'aurais jamais pu découvrir le vrai côté de la recherche.

Il me serait impossible de ne pas remercier très chaleureusement le docteur Yves Paquette, celui qui m'a initié, de très belle façon, aux vertus de la biologie moléculaire. C'est par sa compétence et ses connaissances sans bornes, en plus de sa patience infinie, que j'ai pu acquérir la majeure partie de mes connaissances en laboratoire.

Au cours de ces nombreuses années, j'ai eu l'occasion d'échanger idées et connaissances avec bon nombre de collaborateurs. J'aimerais tout particulièrement remercier les équipes des Dres Mader, du département de biochimie, et Mes-Masson, de l'hôpital Notre-Dame, qui ont bien voulu m'accepter pour des stages d'apprentissage.

Merci aussi à tout ceux et celles qui ont eu à partager une partie de leur vie laborantine avec moi: Carole Tardif, Benoît Filion, Jacques Lemarbre, Henri Knafo, Gilles Robitaille, Claude Dorais, Normand Vigneault, Chantal Boisvert, Frédéric Massicotte, Pascal Amireault, John Yi, Christelle Bouchard et Isabelle Masseur. Un merci tout particulier à Martin Loignon et Sébastien Soubeyrand. Enfin, un énorme merci à Brigitte Malette, qui a toujours été présente pour m'encourager et me changer les idées quand c'était nécessaire.

1. Introduction

1.1- L'oviducte

1.1.1-Historique

L'existence anatomique des oviductes est connue depuis près de trois millénaires, les premières mentions étant faites dans des écrits médicaux Hindous vers 1000-800 av. J.-C. Par la suite, de grands noms de la médecine grecque, tels Aristote (IV^e S av. J.-C.), Hérophile (III^e S. av. J.-C.) et Galien (II^e S. ap. J.-C.) les mentionnent dans leurs travaux. Il est à noter que c'est ce dernier qui, le premier, a correctement décrit les oviductes comme des conduits reliant les ovaires à l'utérus. Ces travaux seront utilisés pendant près de 14 siècles après sa mort. Il faut attendre 1561, avec les *observationes anatomicae* de Gabriele Fallopio, dit Fallopius, pour enfin avoir une description correcte et détaillée de cet organe. L'apparence de l'oviducte lui rappelant un instrument de musique - le tuba -, il nomme cet organe *tuba uterí*, qui est quelques fois traduit par "tube utérin". C'est donc en l'honneur de cet anatomiste que l'oviducte humain est généralement connu sous le vocable de trompe de Fallope (Hunter, 1988, et références incluses) (fig.1).

1.1.2- Rôles dans la fécondation, origine embryonnaire et description anatomique de l'oviducte

L'oviducte est bien plus qu'un simple conduit: il est le siège de la maturation finale de l'ovocyte (dispersion de la *corona radiata*, modification de la zone pellucide (ZP) par le fluide tubaire) et du spermatozoïde (capacitation), de la fécondation ainsi que des premières étapes du développement embryonnaire. Un rôle actif de l'oviducte dans ces différents phénomènes est suggéré par une participation de l'oviducte à l'élaboration du fluide tubaire (voir plus loin). Durant le développement embryonnaire, l'oviducte dérive de la partie proximale du canal de Müller qui, en absence de testicules embryonnaires et d'hormones sexuelles masculines, a la possibilité de se développer pour donner naissance à l'oviducte. Deux facteurs engendrent donc le développement de l'oviducte et du reste des organes génitaux féminins: l'absence de chromosome Y et l'absence également du facteur anti-Müllerien, sécrété par les cellules de Sertoli du testicule (Hunter, 1988 et références incluses).

Les oviductes sont des conduits d'apparence cylindrique situés entre chacun des ovaires et l'utérus. Les oviductes sont donc au nombre de deux, et peuvent être appelés tube utérin ou, chez l'humain, trompe de Fallope. Par souci de clarté et de concision, l'utilisation d'oviducte, au singulier, nom générique donné à cet organe, sera utilisé dans le reste de ce travail. De même, le gamète femelle, connu sous le nom d'oeuf chez l'humain, sera désigné sous le terme générique d'ovocyte pour décrire l'oeuf avant la fécondation, et

sous le terme d'embryon, suivi du nombre de cellules, suivant la fécondation (e.g. embryon à 2 cellules).

L'oviducte est composé, de la lumière de l'organe vers l'extérieur, d'une muqueuse, constituée d'un épithélium cylindrique simple séparé du tissu conjonctif sous-jacent très vascularisé par une membrane basale, formant de nombreux replis; d'une musculature, formée de couches concentriques de muscles circulaires et longitudinaux (l'ordre des couches musculaires varie selon l'espèce); et, finalement, d'une mince séreuse, richement vascularisée (Crespeau et Mialot, 1979; Brower et Anderson, 1969). L'apport sanguin au niveau du tube provient principalement des artères utérine et ovarienne, qui forment de nombreuses ramifications irriguant la séreuse (artère de moyen calibre) et la couche conjonctive de la muqueuse (vaste réseau de capillaires sanguins) de l'oviducte (Hunter, 1988; Crespeau et Mialot 1979). À l'approche de l'ovulation, l'apport sanguin est fortement augmenté au niveau de l'infundibulum et de l'ampoule, dû à l'effet vasodilatateur des œstrogènes ovariens sur l'endothélium de ces vaisseaux sanguins. Les œstrogènes passent de la veine utéro-tubaire à l'artère ovarienne par un procédé de transfert à contre-courant (Hunter, 1988 et références incluses). En parallèle à la vascularisation sanguine, un important système lymphatique irrigue l'oviducte, avec de nombreux capillaires lymphatiques prenant naissance dans la couche conjonctive de la muqueuse. De même que pour le réseau sanguin tubaire, le système lymphatique atteint son volume maximal lors de la phase folliculaire du cycle menstruel (Crespeau et Mialot, 1979).

Du point de vue anatomique, on distingue généralement quatre régions composant l'oviducte mature. L'oviducte débute, à son extrémité ovarienne, par le pavillon, la partie de l'oviducte présentant le diamètre le plus grand. Le pavillon est lui-même formé d'une partie tubulaire conique, appelée infundibulum, qui se prolonge vers l'ovaire par une région nommée fimbriae, comprenant de nombreuses projections (Crespeau et Mialot, 1979). Le pavillon s'ouvre sur la cavité péritonéale, à proximité de l'ovaire, et capte l'ovocyte lors de l'ovulation. Chez certaines espèces animales, dont les rongeurs (Hunter 1988 et références incluses), l'infundibulum forme plutôt une enveloppe plus ou moins close autour de l'ovaire que l'on nomme bourse ovarienne. La partie anatomique succédant à l'infundibulum, en progressant de l'ovaire vers l'utérus, est appelée ampoule (Ménézo et Guérin, 1997). Cette section est caractérisée par une muqueuse bien développée formant de nombreux et profonds replis, recouverte de couches musculaires relativement minces. L'isthme, succédant à l'ampoule, est la partie de l'oviducte la plus mince. Les couches musculaires sont beaucoup plus développées que dans l'ampoule, et l'amplitude et la complexité des replis formés par la muqueuse y sont moindres que dans l'ampoule. La couche musculaire circulaire de l'isthme est fortement innervée, en particulier de terminaisons nerveuses adrénérergiques, alors que dans l'ampoule et l'infundibulum, les terminaisons adrénérergiques sont principalement retrouvées au niveau des vaisseaux sanguins. De plus, l'irrigation lymphatique de l'isthme est plus importante que celle de l'ampoule. Finalement, l'oviducte rejoint l'utérus par la partie intramurale, aussi appelée jonction utéro-tubaire.

Le calibre de l'oviducte est moins large qu'il ne semble, dû principalement aux replis formés par la muqueuse. L'épithélium tubaire est composé principalement de deux types cellulaires: des cellules ciliées ainsi que des cellules sécrétrices non-ciliées. La proportion de cellules ciliées est la plus élevée dans les fimbriae du pavillon, où elles sont majoritaires. Pour l'ampoule et l'isthme, la proportion de chacun des deux types cellulaires varie selon les espèces et les observateurs. Certains rapportent une proportion plus élevée de cellules sécrétrices dans l'ampoule que dans l'isthme (Hadek, 1953; Hadek 1955), d'autres la prédominance des cellules sécrétrices dans l'isthme (Koester, 1969; Crespeau et Mialot, 1979; Hunter, 1988) et d'autres encore avancent une distribution équivalente des deux types cellulaires (Hollis et coll., 1984). Certains vont jusqu'à suggérer l'alternance entre les deux types cellulaires selon le moment du cycle ovarien (Greenwald, 1958; Jansen, 1980). Chez le lapin, Brower et Anderson (1969) observent une prédominance des cellules ciliées au sommet et sur les côtés des replis de la muqueuse, alors que les cellules sécrétrices sont concentrées dans les creux formés par les replis.

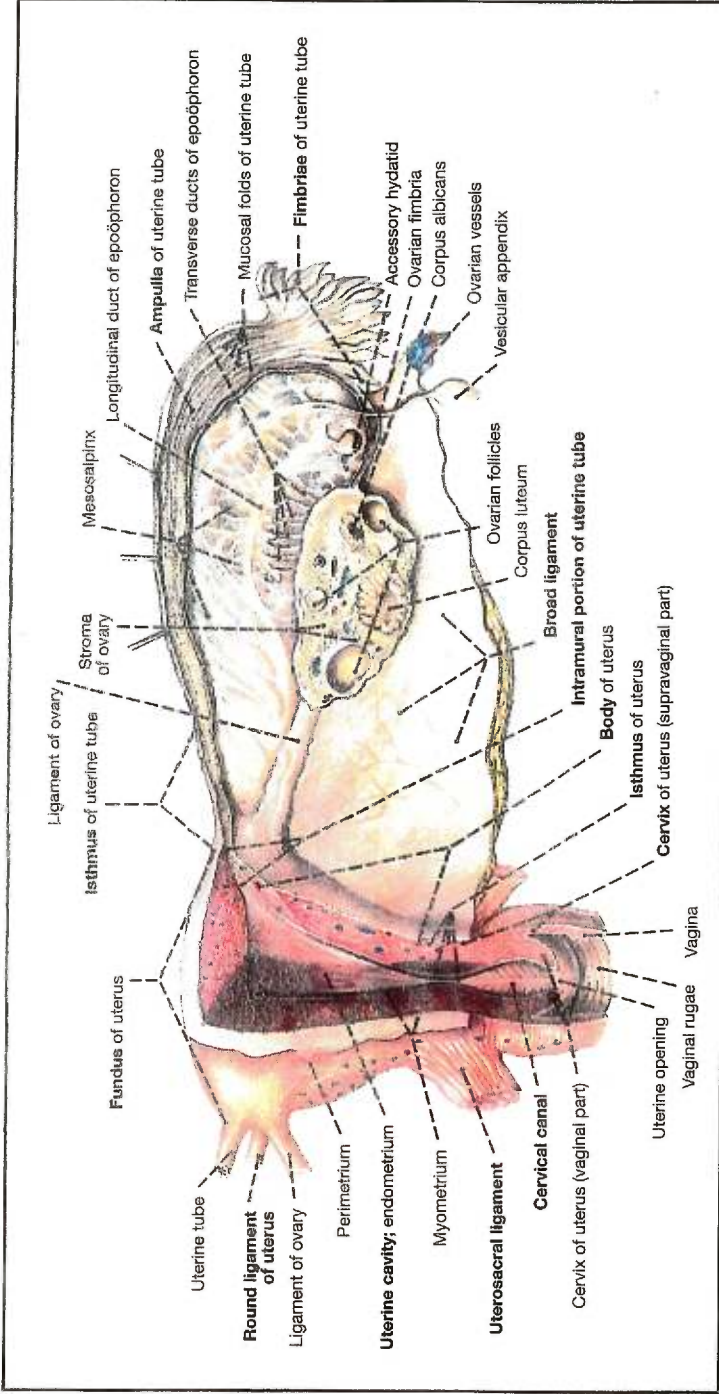


fig. 1: Représentation schématique du tractus génital féminin, tel qu'il serait exposé par une coupe frontale. Notez l'appellation de tube utérin pour désigner l'oviducte. Chez le hamster, la principale différence réside dans le fait que l'ovaire est englobé dans une structure appelée bourse ovarienne. Tiré de Velker, J 1997: *Clemente Anatomy (4th Edition)*.

1.2- Effets des œstrogènes sur l'oviducte

Les hormones ovariennes affectent grandement la morphologie de l'oviducte ainsi que celle de l'épithélium tubaire. Les œstrogènes, en plus d'augmenter l'afflux sanguin et lymphatique, agissent également sur les deux types cellulaires principaux de l'épithélium de l'oviducte. Chez certaines espèces, dont le hamster, il semble exister un mécanisme de transfert à contre-courant, puisque plusieurs auteurs ont observé une concentration plus élevée d'hormones stéroïdiennes dans les artérioles irriguant la trompe que dans la circulation systémique (Hunter et Poyser, 1983; Boatman, 1997). À ce sujet, il a été proposé qu'un transfert par diffusion, de la veine ovarienne aux artères ovarienne et utéro-tubaire, ou encore via le réseau lymphatique, soit à l'origine de ce phénomène (Hunter et Poyser, 1983).

1.2.1- Effet des œstrogènes sur les cellules sécrétrices

Selon certains auteurs, les œstrogènes ne causeraient de changements cycliques que dans les cellules sécrétrices (Borell et coll., 1956). L'augmentation de la concentration circulante d'œstrogènes coïncide avec l'apparition, dans les cellules sécrétrices, d'un bourgeonnement de la partie apicale de leur membrane plasmique, accompagné d'une accumulation accrue de nombreux granules de sécrétion (Hadek, 1955; Borell et coll., 1956; Greenwald, 1958; Stone et Hamner, 1975; Crespeau et Mialot, 1979; Jansen, 1980; Jansen et Bajpai, 1982, 1983; Hollis et coll., 1984; Kan et coll.,

1989). Il faut toutefois mentionner que des granules de sécrétion peuvent être observés durant tout le cycle; c'est donc leur nombre et leur maturité qui atteint son maximum en période d'oestrus (Brower et Anderson, 1969; Crespeau et Mialot, 1979). Plusieurs études indiquent que le processus de sécrétion se fait par exocytose (Brower et Anderson, 1969; Stone et Hamner, 1975; Kan et coll., 1989). Le taux maximal de sécrétion est observé à la période périovulatoire, dans un laps de temps englobant la présence de l'ovocyte dans l'oviducte (Koester, 1969; Stone et Hamner, 1975; Buhi et coll., 1999). Bien que l'effet des œstrogènes sur l'augmentation de l'activité synthétique de ce type cellulaire soit généralement reconnu, le rôle de la progestérone est plus obscur. Certains suggèrent que la progestérone serait nécessaire à la libération du contenu des granules de sécrétion (Greenwald, 1958; Stone et Hamner, 1975), alors que d'autres avancent le contraire (Jansen et Bajpai, 1982).

Il semble que les différentes parties de l'oviducte ne réagissent pas toutes de la même façon aux œstrogènes, tant au point de vue quantitatif que qualitatif. Au niveau de l'activité sécrétrice, l'isthme serait beaucoup plus sensible que l'ampoule (Stone et Hamner, 1975; Jansen, 1980), vraisemblablement à cause des différentes proportions de cellules sécrétrices dans ces deux parties de l'oviducte. De plus, Jansen et Bajpai (1982) rapportent des différences physico-chimiques entre le contenu des granules de sécrétion retrouvés dans l'isthme et l'ampoule chez le lapin, et observent même l'absence de sécrétion dans l'ampoule chez le macaque (Jansen et Bajpai, 1983). À

l'opposé, il a été rapporté que l'isthme de la brebis ne participe pas, ou très peu, à la sécrétion (Hollis et coll., 1984).

1.2.2-Effet des œstrogènes sur les cellules ciliées

Au niveau des cellules ciliées, la hausse du niveau circulant d'œstrogènes durant la phase folliculaire correspond, chez certaines espèces, à un accroissement de la ciliogenèse, bien que les cils soient présents tout au long du cycle oestral (Crespeau et Mialot, 1979). L'activité ciliaire devient plus intense en présence de taux élevés d'œstrogènes, en particulier dans l'ampoule et le pavillon, régions dont l'épithélium comprend une forte proportion de ces cellules. Pour certains, cette activité ciliaire est considérée comme nécessaire pour la progression de l'ovocyte fraîchement ovulé vers l'isthme (Crespeau et Mialot, 1979); toutefois, des études chez des femmes atteintes du syndrome de Kartagener, dont l'une des manifestations est une absence plus ou moins prononcée de cils pouvant produire des battements, ont montré que l'absence d'activité ciliaire n'entrave pas obligatoirement la fertilité des femmes atteintes (Bleau et coll., 1978; Jean et coll., 1979; McComb et coll., 1986). Une étude récente chez le rat semble toutefois démontrer que la déciliation se produit tout au long du cycle, avec un taux plus élevé durant la période précédant la phase œstrale. Les œstrogènes n'auraient pas d'effets sur la vitesse ou l'importance de la déciliation chez cette espèce (Reeder et Shirley, 1999).

1.2.3-Effet des œstrogènes sur l'ensemble de l'oviducte

Au niveau de l'oviducte *per se*, il a été rapporté que l'isthme et l'ampoule exercent, à la période péri-ovulatoire, des contractions coordonnées produisant un courant de fluide tubaire vers l'ovaire chez le hamster (Battalia et Yanagimachi, 1979). Ces contractions favoriseraient le transport des spermatozoïdes vers l'ampoule. De plus, l'augmentation des apports sanguin et lymphatique à l'oviducte provoquée par la hausse d'œstrogènes est suivie de près par une augmentation du volume du fluide tubaire (Hamner, 1971).

1.3- Composition du fluide tubaire

La lumière de l'oviducte est remplie d'une solution physiologique aqueuse, appelée fluide tubaire, qui comprend une variété de protéines, acides aminés, ions organiques et inorganiques, gaz, etc. Bien que la présence dans l'épithélium tubaire de cellules sécrétrices soit connue depuis la fin du XIX^e siècle, Hadek (1955) est l'un des premiers à suggérer et observer une sécrétion active par l'épithélium tubaire. Ses études démontrent en effet la présence d'un mucopolysaccharide présent dans les granules de sécrétion des cellules sécrétrices ainsi que dans le fluide tubaire. Qui plus est, Hadek remarque que la sécrétion devient maximale à l'ovulation, et suspecte une influence des hormones sexuelles sur cette sécrétion. Cette hypothèse est étayée par les observations de Bishop (1956), qui, de plus, rapporte que malgré ses ouvertures à chaque extrémité, l'oviducte ne reçoit pas ou très peu des fluides péritonéal et utérin. Il

semble donc que l'oviducte produise lui-même un fluide qui lui est propre, et bien adapté aux événements se déroulant en son sein.

De leur côté, Gothié et Moricard (1955) observent une forte incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans les glycoprotéines sécrétées par l'oviducte; l'incorporation moyenne est supérieure et plutôt stable dans l'isthme, alors qu'elle est généralement plus faible dans l'ampoule, avec par contre une nette hausse à l'ovulation. Ils observent également une redistribution de $^{35}\text{SO}_4$ dans la ZP de l'ovocyte et de l'embryon durant le transit tubaire, sans toutefois noter un marquage du cytoplasme de l'ovocyte/embryon.

1.3.1- Transsudation à partir du sérum sanguin

Plusieurs travaux ont démontré, par immunoélectrophorèse, que la majorité des protéines du sérum sanguin sont retrouvées, généralement en plus faible concentration, dans le fluide tubaire, suggérant ainsi un processus de transsudation chez plusieurs espèces: singe Rhésus (Marcus et Saravis, 1965); humain (Moghissi, 1970); lapin (Shapiro et coll., 1971,1974; Feigelson et Kay, 1972; Sacco and Shivers, 1973) et hamster doré (Fox et Shivers, 1975a). La concentration en protéine du fluide tubaire est moitié moindre de celle du sérum sanguin (Moghissi, 1970). L'albumine sérique représente la protéine majeure du fluide tubaire (Hamner, 1971; Ménézo et Guérin, 1997), mais l'on retrouve aussi des immunoglobulines (Ig) (sauf les IgM), parmi lesquelles les IgG sont prépondérantes (Lippes et coll., 1972; Oliphant et coll., 1978).

1.3.2- Sécrétion de l'épithélium tubaire

L'impact majeur des études d'immunophorèse a toutefois été de démontrer hors de tout doute la présence de protéines du fluide tubaire absentes du sérum. Des travaux cités précédemment, ceux de Moghissi (1970) chez l'humain, Shapiro et coll. (1974) chez le lapin, et Fox et Shivers (1975a) chez le hamster doré s'imposent en particulier. Moghissi est le premier à observer, durant la phase sécrétrice du cycle menstruel, une glycoprotéine du fluide tubaire absente du sérum, et à en attribuer l'origine à l'oviducte. Fox et Shivers font des études similaires, et observent un antigène spécifique à l'utérus et l'oviducte, et suggèrent l'implication des stéroïdes ovariens dans la distribution et l'abondance de cet antigène. Il ressort de ces études que le fluide tubaire est une combinaison de transsudation et de sécrétion de la part de l'épithélium tubaire. Depuis, un grand nombre de protéines, spécifiques ou non à l'oviducte, ont été identifiées comme étant sécrétées par les cellules de l'épithélium tubaire lors d'études d'incorporation de radio-isotopes (Buhi et coll., 1999).

1.4- Identification de protéines spécifiques à l'oviducte

Shapiro et coll. (1974) sont les premiers à isoler une protéine du fluide tubaire absente du sérum sanguin. À cette époque, il est connu depuis plusieurs années que les cellules sécrétrices de l'oviducte renferment des granules de sécrétion contenant un composé de nature mucopolysaccharidique acide (Hadek 1955; Greenwald, 1958; Brower et Anderson, 1969); de plus, chez le lapin, il était bien connu que

l'ovocyte, durant son transit dans l'oviducte, est recouvert d'une épaisse couche de mucine.

Shapiro et coll. (1974) procèdent donc à l'isolement d'une glycoprotéine acide du fluide tubaire chez le lapin, déterminent sa masse moléculaire relative en conditions dénaturante et réductrice (73000), estiment à 30% sa composition en groupements glycosylés et, surtout, observent l'association de cette glycoprotéine acide à la ZP entourant l'ovocyte et l'embryon en début de développement. Toutefois, l'origine tubaire de cette glycoprotéine n'est pas démontrée. Un second article de Fox et Shivers (1975b) démontre cependant que le(s) antigène(s) spécifique(s) à l'oviducte et l'utérus qu'ils ont préalablement observé(s) (Fox et Shivers, 1975a) s'associe(nt) à la ZP de l'ovocyte (et de l'embryon) tubaire, mais pas à celle de l'ovocyte ovarien.

Par la suite, des travaux confirment la présence de glycoprotéines sulfatées dans le fluide tubaire de lapin (Hanscom et Oliphant, 1976; Oliphant et Ross, 1982; Hyde et Black, 1986; Erickson-Lawrence et coll., 1989); l'une d'elle, de masse moléculaire de 72400 et d'origine tubaire, rappelle celle observée par Shapiro et coll. (1974) (Barr et Oliphant 1981). Des glycoprotéines similaires sont aussi retrouvées chez la brebis (Sutton et coll., 1984; Gandolfi et coll., 1989), la souris (Kapur et Johnson, 1985, 1988), la truie (Brown et Cheng, 1986), la femelle du babouin (Fazleabas et Verhage, 1986; Boice et coll., 1990a), la femelle du hamster (Léveillé et coll., 1987; Araki et coll., 1987; Robitaille et coll., 1988; Oikawa et coll., 1988), la vache

(Malayer et coll., 1988) et chez la femme (Verhage et coll., 1988, 1989). Bien que la masse moléculaire de ces glycoprotéines varie beaucoup d'une espèce à l'autre, nombre de points communs les caractérisent, outre leur glycosylation: elles sont sécrétées par les cellules sécrétrices de l'épithélium tubaire et sont spécifiques à l'oviducte; s'associent à la ZP entourant l'ovocyte et l'embryon tubaires; présentent, pour la plupart, une sécrétion cyclique coïncidant avec une hausse du niveau circulant d'œstradiol; et possèdent des groupements sulfatés.

1.4.1- L'oviductine de hamster et ses homologues

En rétrospective, il est possible de retracer l'histoire de l'oviductine de hamster jusqu'aux travaux de Fox et Shivers (1975a et 1975b). Bien que des travaux semblables aient été effectués un an plus tôt chez le lapin (Shapiro et coll., 1974), les travaux de Fox et Shivers (1975b) sont les premiers à démontrer qu'il existe un antigène qui, en plus de pouvoir s'associer à la ZP, est spécifique au tractus génital de la femelle. Ces résultats seront ensuite étayés par ceux de Léveillé et coll. (1987) et Araki et coll. (1987). Chez le hamster, il semble que ce soit l'isthme de l'oviducte qui soit le plus actif au niveau de la synthèse de l'oviductine (Léveillé et coll., 1987).

C'est en 1988 qu'est suggéré le terme d'oviductine pour décrire cette famille de glycoprotéines tubaires (Robitaille et coll., 1988; St-Jacques et Bleau, 1988). Chez le hamster, il est démontré que l'oviductine s'associe à la ZP de façon uniforme dans toute l'épaisseur

de celle-ci; certains observent aussi sa présence dans l'espace périvitellin, c'est-à-dire l'espace situé entre la ZP et la membrane plasmique de l'ovocyte (Abe et Oikawa, 1990, Kan et coll., 1993). La présence de l'oviductine dans le complexe de Golgi ainsi que les granules de sécrétion des cellules sécrétrices de l'oviducte, mais non dans les cellules ciliées, a été confirmée par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal (Kan et coll., 1989). Alors que la plupart des travaux de cette période rapportent qu'il n'y a pas d'internalisation d'oviductine par l'ovocyte tubaire (Kan et coll., 1988; Bleau et St-jacques, 1989; Abe et Oikawa, 1990), Kan et Roux (1993) observent, par immunolocalisation, la présence d'oviductine dans des compartiments endocytiques chez l'embryon de hamster, c'est-à-dire après qu'il y ait eu fécondation. Ces travaux, suggérant ainsi l'internalisation de l'oviductine, ne déterminent toutefois pas si ce processus est dû à la liaison par l'oviductine d'un récepteur de la membrane plasmique de l'embryon.

Il est connu depuis longtemps que les cellules sécrétrices de l'oviducte produisent une glycoprotéine acide sulfatée. Léveillé et collaborateurs (1987) ont remarqué que le lieu de synthèse de l'oviductine de hamster (qui ne sera baptisée ainsi qu'un peu plus tard) coïncidait parfaitement à celui de ladite glycoprotéine acide sulfatée. Une autre équipe remarque que le signal produit en immunohistochimie par un anticorps monoclonal reconnaissant l'oviductine disparaît après traitement à l'acide periodique-Schiff (Araki et coll., 1987), indiquant que l'épitope reconnu est formé de groupements glycosylés. De plus, cette équipe détermine que

l'oviductine a une masse moléculaire de 200 kDa, due en majeure partie à une glycosylation importante, résultats qui seront corroborés par Robitaille et coll. (1988). Toutefois, les équipes de Lèveillé et d'Araki ont utilisé pour leur travaux des anticorps réagissant avec un épitope formé de groupements glycosylés. Ce n'est qu'en 1992 que St-Jacques et coll. (1992) démontrent qu'il y a bel et bien ajout d'une glycoprotéine d'origine tubaire à la ZP, et non un simple transfert de groupement(s) glycosylé(s) d'une composante du fluide tubaire à une glycoprotéine de la ZP par une glycosyltransférase .

Plusieurs travaux ont par la suite confirmé la nature glycoprotéique de l'oviductine de hamster, dont ceux de Malette et Bleau (1993) qui en présentent une étude biochimique approfondie. Ces travaux soulignent avant tout l'importante hétérogénéité de masse et de charge, principalement due à des niveaux de glycosylations différents. L'utilisation de lectines montre, entre autres, la présence de groupements α -D-N-acétylgalactosamine terminaux et de résidus α -D-acide sialique terminaux ou de β -D-(N-acétylglucosamine)₂ internes. Deux isoformes distinctes sont observées: la forme α , qui possède un point isoélectrique (pI) de 3,5-4,5 et une masse moléculaire apparente de 160-210 kDa et β , qui a un pI beaucoup plus basique et une masse moléculaire apparente de 210-350 kDa. Néanmoins, il appert que ces deux isoformes ne diffèrent que par leur taux de glycosylation, puisqu'elles possèdent la même séquence amino-terminale; de surcroît, une déglycosylation de la forme β produit une forme très semblable à la forme α . De plus, la mise à jour de l'existence de deux allèles ne différant que par le nombre de répétitions en tandem indique

que ces deux isoformes ne sont probablement que les produits de ces deux allèles vu que l'existence de plusieurs copies du gène, ou d'une famille de gènes très similaires, ont été écartées (voir la section des résultats). L'oviductine, sous ses deux isoformes, n'est pas phosphorylée, mais elle contient des groupements sulfates sur ses groupements glycosylés. Bien que l'oviductine possède des groupements glycosylés liés à l'azote (N-glycosylation), la majorité de ces derniers sont liés à l'oxygène (O-glycosylation), l'apparentant ainsi à la famille des mucines. Il importe aussi de souligner que ces travaux ont démontré que l'oviductine n'est pas un protéoglycan, malgré la présence de nombreux groupements glycosylés liés à l'oxygène.

Avant que les travaux décrits dans la présente thèse ne soient entrepris, à l'été 1993, seule la séquence partielle de l'oviductine de babouin avait été publiée (Donnelly et coll. 1991), alors que celle de l'oviductine bovine était disponible dans la banque de séquence Genbank, pour être publiés un peu plus tard (Sendai et coll., 1994). Les séquences de ces deux ADNc étaient assez similaires pour permettre de croire à un rôle biologique commun et important, vu la conservation de la séquence protéique déduite entre deux espèces aussi différentes que le babouin et le bovin. Depuis, la séquence d'ADNc d'homologues de l'oviductine a été obtenue chez près d'une dizaine d'espèces de mammifères. Un résumé de la taille de l'ADNc et du peptide déduit de chacun des homologues de l'oviductine de hamster est présenté dans le tableau I. Parmi les faits à noter, mentionnons que l'ensemble des oviductines présentent une portion amino-terminale apparentée aux chitinases, alors que seules les

oviductines murine, humaine et de hamster contiennent des répétitions en tandem d'acides aminés, de nombre et de séquence variables entre ces espèces. Il semble toutefois que la forte proportion de résidus pouvant porter des sucres O-liés dans la partie carboxy-terminale soit conservée chez toutes les oviductines.

1.4.2- Rôles biologiques proposés de l'oviductine

Bien que le rôle biologique précis de l'oviductine soit encore inconnu, plusieurs rôles lui ont été imputés au cours des années, principalement suite à des expériences de co-incubation dans lesquelles on ajoutait de l'oviductine au milieu.

Parmi ces rôles, plusieurs observateurs rapportent la liaison de l'oviductine à la surface du spermatozoïde, et ce dès 1984 chez l'ovin (Sutton et coll., 1984b). Pour ce qui est des rôles déduits ou suggérés suite à ce genre d'observations, Kimura, chez le hamster, propose une participation de l'oviductine dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte (Kimura et coll. 1994), ce qui est sensiblement corroboré par l'équipe de King et Killian (1994) chez le bovin. D'autres équipes, par contre, impliquent l'oviductine comme facteur facilitant la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde chez l'humain (O'Day-Bowman et coll., 1996) et chez le hamster (Boatman et coll., 1994b; Boatman et Magnoni, 1995), entre autres.

Dans un autre ordre d'idée, il a aussi été suggéré que l'oviductine, par sa quasi-omniprésence, serve à empêcher l'attaque de l'embryon et des spermatozoïdes par le système immunitaire de la femelle (Oliphant et coll., 1984a; Thomas et coll., 1991). L'équipe de Thomas (1991) suggèrent que l'oviductine inhiberait la voie classique du complément, mais pas la voie alternative.

Les équipes de Jansen (1978; 1980; 1982; 1983) et de Koester (1969) avancent un rôle du mucus dans le tri des spermatozoïdes et dans le blocage de l'isthme retardant l'entrée de l'ovocyte, respectivement. Évidemment, ces rôles n'impliquent pas seulement l'oviductine, mais suggèrent l'importance de la viscosité du fluide tubaire. À cet effet, il sera montré dans la section résultats que l'oviductine possède tous les attributs permettant de la considérer comme une mucine, et donc que celle-ci pourrait jouer un rôle important dans l'obtention d'un mucus tubaire.

Un rôle de l'oviductine dans le contrôle de la division embryonnaire a également été proposé par certaines équipes, suite à des observations rapportant la présence d'oviductine à l'intérieur ou à la surface de l'embryon, et ce chez plusieurs espèces: ovin (Gandolfi et coll., 1989), babouin (Boice et coll., 1990a), porc (Buhi et coll. 1993) et hamster (Kan et Roux, 1993). Notons que ces derniers présentent de convaincantes photographies en microscopie électronique montrant l'internalisation de l'oviductine, bien qu'il n'ait pas été démontré que cette internalisation soit médié par un récepteur. De plus, Murray et Messinger (1994) observent une distribution mutuellement exclusive

de l'oviductine et de l'actine pour l'embryon à 2 cellules, mais identique aux stades 4- et 8-cellules; les auteurs proposent un rôle de l'oviductine dans le bon positionnement des blastomères.

Enfin, l'équipe de Bleau et collaborateurs -en partie grâce aux travaux présentés dans cette thèse- avance plutôt un rôle mécanique que biologique, basé en grande partie sur les propriétés de type mucine de l'oviductine. Dans ce modèle, l'oviductine protégerait à la fois l'épithélium tubaire, auquel on la retrouve aussi associée, que l'ovocyte/embryon précoce. De plus, la présence de nombreuses charges négatives portées par les groupements glycosylés (Malette et Bleau, 1993), de même que la viscosité engendrée par sa présence dans le fluide tubaire, pourrait également servir à empêcher l'implantation de l'embryon dans la trompe, et ainsi diriger indirectement l'implantation vers l'utérus. Soulignons aussi que la partie apparentée aux chitinases pourrait bien permettre à l'oviductine de reconnaître et lier certains groupements glycosylés, tel que ceux retrouvés chez les glycoprotéines composant la zone pellucide, ou même à la surface d'agents pathogènes.

1.5- Les mucines

Tel qu'il en sera discuté plus en détails dans les sections résultats et discussion, l'oviductine de hamster présente des caractéristiques permettant de la classer à la fois dans la famille des mucines et des protéines apparentées aux chitinases (PAC).

1.5.1.- Définition d'une mucine

Plusieurs définitions des mucines existent. La plus simple considère comme mucine une protéine dont plus de 50% de la masse est due à des groupements O-glycosylés (Gendler et Spicer, 1995); d'autres, par ailleurs, définissent plutôt comme mucine une glycoprotéine composée de 20 à 55% de résidus P, T et S, si ceux-ci sont concentrés en une ou plusieurs régions précises, et que les résidus S et T soient porteurs de suffisamment de groupements O-glycosylés pour comprendre 40 à 80% de la masse moléculaire de la glycoprotéine mature (Van Klinken et coll., 1995). Cette définition permet d'inclure les mucines endothéliales et leucocytaires, telles CD34, GlyCAM-1 (bien que GlyCAM-1 ait également été isolée comme un produit sécrété de l'épithélium mammaire (Van Klinken et coll. et références incluses, 1995), MAd-CAM1, etc. Une autre définition ajoute aux critères précédents la présence de répétitions en tandem d'un domaine riche en P, T et S (Strous et Dekker, 1992; Porchet et coll., 1999); ces critères excluent toutefois la majorité des mucines endothéliales et leucocytaires, qui, sauf dans de rares cas, ne présentent pas de telles répétitions (Van Klinken et coll., 1995). De

plus, les mucines épithéliales peuvent être sécrétées, telles MUC2 et MUC7, ou de type transmembranaire, telle MUC1. Les mucines de types endothéliales et leucocytaires sont pour leur part associées à une membrane, la plupart du temps par un domaine transmembranaire (Van Klinken et coll., 1995).

1.5.2- Types de mucines

1.5.2.1- Mucines épithéliales vs mucines endothéliales et leucocytaires

La dichotomie la plus utilisée pour caractériser l'ensemble des mucines repose sur le type de tissus qui les produisent. Les mucines les plus connues, de la famille MUC, sont des glycoprotéines d'origine épithéliale. Cette famille comprend, chez l'humain, huit mucines officiellement reconnues, soit MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC7; deux autres glycoprotéines ont été suggérées comme membres de cette famille, soit MUC8, une protéine O-glycosylée des voies respiratoires (Porchet et coll., 1999 et références incluses) et MUC9, qui n'est autre que le pendant humain de l'oviductine de hamster (Lapensée et coll., 1997), portant le nombre total de mucines reconnues à dix (Lagow et coll., 1999). Cependant, on regroupe également sous le terme de mucine des protéines O-glycosylées d'origine endothéliale et leucocytaire (Porchet et coll., 1999). Toutefois, les caractéristiques permettant d'affilier une glycoprotéine à la famille des mucines sont, encore aujourd'hui, inspirées des huit mucines épithéliales reconnues. Il est à noter que

ce sont plutôt des caractéristiques, et non une similarité de séquence peptidique, qui permettent cette affiliation.

1.5.2.2 Mucines sécrétées vs mucines associées à la membrane

Cette classification se base plutôt sur le rôle biologique, certifié ou supposé, des différents types de mucines. Aux mucines sécrétées, jouant un rôle de protection des épithélia qui les produisent vu leur capacité à former un mucus très visqueux, on oppose les mucines associées à la membrane, auxquelles on suppose plutôt des fonctions de molécules d'adhésion ou de reconnaissance. Les mucines sécrétées forment invariablement des oligomères par l'entremise de ponts disulfures intermoléculaires, alors que les mucines associées à la membrane sont toujours sous forme monomérique (Strous et Dekker, 1992; Gendler et Spicer, 1995). Il faut noter, cependant, que MUC 1, une mucine épithéliale possédant un domaine d'ancrage transmembranaire, est un peu laissée en plan par cette classification, vu qu'on lui attribue surtout un rôle de protection, mais qu'elle est de type membranaire et qu'on ne la retrouve que sous forme monomérique.

1.5.3- Caractéristiques des mucines épithéliales

La présence de répétitions en tandem plus ou moins parfaites, tant au niveau du gène que de la protéine, est la caractéristique la plus distinctive des mucines épithéliales. À l'échelle peptidique, ce domaine des mucines est composé d'une forte proportion de résidus proline (P), thréonine (T) et sérine (S) (domaine PTS), concentrant ainsi la majeure partie des groupements O-glycosylés dans cette région de la mucine, lui donnant l'apparence d'une brosse à bouteille, où les soies de la brosse représentent les groupements O-glycosylés, et la tige représente le squelette peptidique. La présence de nombreux résidus P confère à cette région une conformation déployée (Strous et Dekker, 1992; Van Klinken et coll., 1995; Shankar et coll., 1997). On pense aussi que la présence de P serait importante dans le contrôle de la spécificité de la galactosaminyl transférase impliquée initialement dans la synthèse des oligosaccharides des mucines (Gum, 1995 et références incluses). Finalement, la capacité des résidus P à induire une conformation de type coude β permettrait une haute densité de groupements O-glycosylés dans les régions riches en P (Strous et Dekker, 1992) Ces groupements glycosylés peuvent totaliser jusqu'à plus de 85% de la masse moléculaire de la mucine. Ce domaine est encodé, au niveau du gène, par un seul exon, qui peut atteindre une taille de 19 kilobases (kb) chez *MUC4*. De la nature répétitive de ces séquences découle un polymorphisme interindividuel qui affecte tout aussi bien le nombre de répétitions que leur séquence. Le degré de polymorphisme reflète en général la taille de l'exon encodant ce domaine (Porchet et coll., 1999).

1.5.4- Propriétés physico-chimiques des mucines épithéliales

Les propriétés physico-chimiques particulières des mucines épithéliales résultent des caractéristiques énumérées ci-haut. Ces mucines, hormis MUC1, forment des oligomères par l'entremise de ponts disulfures, permettant l'obtention de longues molécules linéaires par l'adjonction d'oligomères l'un à la suite de l'autre (Strous et Dekker, 1992). La rigidité du domaine PTS, de même que la présence de nombreux oligosaccharides hydrophiles porteurs, de surcroît, de charges négatives, fait en sorte que les mucines, une fois sécrétées et en absence de fortes concentrations de cations, sont des molécules hautement hydratées. La viscosité du mucus obtenu est directement proportionnelle au nombre de groupements sulfatés et de résidus d'acide sialique (Strous et Dekker, 1992). La présence d'une faible concentration de cations bivalents, tel le calcium, peut s'avérer bénéfique, en permettant des interactions électrostatiques entre des groupements chargés négativement portés par des oligomères différents de mucines. Ces interactions intermoléculaires confèrent au mucus son élasticité.

1.5.5- Saccharides retrouvés chez les mucines

Les mucines sont des glycoprotéines dont la majorité des groupements glycosylés sont liés au squelette peptidique par l'entremise d'un atome d'oxygène (d'où l'appellation d'O-glycosylation) fourni par un résidu S ou T. À la très grande variabilité de la composition, de la taille et du nombre de ces chaînes glycosylées s'oppose un nombre restreint de monosaccharides les composant: on n'y retrouve que le galactose, la *N*-acétylgalactosamine, la *N*-acétylglucosamine, le L-fucose et les acides sialiques de la famille de l'acide *N*-acétylneuraminique (Allen, 1978; Jansen 1995). Contrairement aux glycosaminoglycans et protéoglycans, les mucines ne contiennent donc pas d'acides uroniques (Allen, 1978; Strous, 1992). La présence d'acide sialique et de sulfate en position terminale des groupements glycosylés confère aux mucines une charge électro-négative et par le fait même un caractère acide plus ou moins prononcé suivant le nombre de ces composantes (Van Klinken et coll., 1995).

1.5.6- Mucines épithéliales du tractus génital de la femelle

Comme leur classification l'indique, ces mucines sont exprimées par des cellules épithéliales, et ont pour but principal d'assurer une protection supplémentaire de l'épithélium face à des conditions difficiles (Strous et Dekker, 1992). Ainsi, la présence de mucus dans le tractus génital de la femelle diminue grandement la susceptibilité face

à d'éventuels agents pathogènes du milieu extérieur et, comme il en sera discuté dans la partie discussion, pourrait également jouer un rôle dans l'aiguillage de l'implantation de l'embryon vers l'utérus. Au niveau de l'oviducte, la composition du mucus se résume, chez l'humain, à deux mucines, à savoir MUC1 (Gipson et coll., 1997), associée à la membrane par un domaine transmembranaire, et MUC9, le pendant humain de l'oviductine, sécrétée dans le fluide tubaire (Gipson et coll., 1997; Lagow et coll., 1999). Récemment, chez le rat, il a été démontré que Muc4 -anciennement connue sous l'appellation *sialomucin complex* (SMC)-, est aussi exprimée par l'épithélium tubaire. Muc4 est associée à la membrane par un domaine transmembranaire de sa sous-unité ASGP-2 (*ascite sialoglycoprotein 2*), laquelle est liée de façon non covalente à la sous-unité ASGP-1. Au niveau de l'utérus humain, les mucines MUC1, MUC6 et MUC8 sont exprimées, alors que MUC1 et MUC4 sont retrouvées au niveau du vagin.

1.6 Les chitinases

Les chitinases font partie des glycosyl hydrolases, c'est-à-dire des enzymes pouvant hydrolyser un lien O-glycosidique, anciennement cataloguées sous la nomenclature 3.2.1.14 et désormais incluses dans les familles 18 et 19 des glycosyl hydrolases (Henrissat, 1991). En particulier, les chitinases peuvent hydrolyser la chitine, un homopolymère composé de $\beta(1\rightarrow4)$ N-acétylglucosamine. La chitine est le deuxième biopolymère en importance après la cellulose, et est la composante majeure de l'exosquelette d'invertébrés

tels que les insectes, crustacés et araignées; on la retrouve aussi dans la paroi cellulaire de plusieurs moisissures et chez certaines algues, mais jusqu'à présent elle n'a jamais été observée chez les vertébrés ni les plantes. Cependant, un nombre croissant de protéines possédant une activité chitinolytique ont été identifiées et caractérisées, notamment chez certaines plantes (Collinge et coll., 1993) et chez l'humain (Renkema et coll., 1995; Boot et coll., 1995). Pour l'instant, en particulier pour les plantes, un rôle protecteur contre les organismes parasites est proposé (Collinge et coll., 1993; Gozia et coll., 1993; Ponstein et coll., 1994).

1.7- Les protéines apparentées aux chitinases (PAC)

Les protéines apparentées aux chitinases, quant à elles, n'ont pas d'activité chitinolytique, mais conservent un haut taux de similitude avec cette famille de protéines. L'une des premières protéines apparentées aux chitinases à être identifiée comme telle a été la protéine de cartilage humain, HC gp-39 (Hakala et coll., 1993), qui avait été préalablement isolée de cellules synoviales humaines (Nyirkos et Golds, 1990). Avec la publication des séquences d'ADNc des oviductines de babouin et de bovin dans la banque de données Genbank, il s'est avéré que ces dernières présentaient aussi, dans leur partie amino-terminale, une similitude frappante avec les chitinases, en particulier pour le site actif. Toutefois, il est vite constaté que les oviductines ne possèdent pas certains résidus cruciaux pour l'activité chitinolytique (Arias et coll., 1994; Malette et coll., 1995c). Un résumé

des caractéristiques de cette nouvelle "famille" de protéines a été publié récemment (Bleau et coll., 1999).

1.8- Le cycle ovarien de la femelle

1.8.1- L'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien

C'est dans l'hypothalamus que prend naissance le contrôle du cycle ovarien. Les terminaisons nerveuses que l'on y retrouve ont la capacité de produire et relâcher, lorsque stimulées de façon appropriée, une variété d'hormones, dont l'hormone de relâche des gonadotropines (gonadostimuline; GnRH¹); cette dernière est sécrétée de façon cyclique, obéissant à un mécanisme circadien encore mal compris. La GnRH, lorsque sécrétée, rejoint rapidement les vaisseaux du système porte hypothalamo-hypophysaire pour atteindre, dans l'adénohypophyse (aussi nommée hypophyse antérieure), une population cible de cellules spécialisées, à savoir les cellules gonadotropes.

Sous la stimulation positive de la GnRH, les cellules gonadotropes produisent et relâchent à leur tour deux hormones, soit l'hormone de stimulation du follicule (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Ces deux hormones, de nature peptidique, sont chacune composées de deux sous unités, dénommées α et β ; la sous-unité α est commune pour la LH et la FSH, alors que chacune des hormones

¹ pour plus de clarté, les sigles anglais désignant les hormones seront utilisés, à moins d'avis contraire.

comprend une sous-unité β qui lui est propre (Freeman, 1994). Chez le rat, qui est un modèle animal très similaires au hamster, on observe une augmentation de la synthèse de l'ARNm de la sous-unité α à la fin du stade de diœstrus 2, alors que la synthèse des messagers des sous-unités β de la LH et de la FSH augmente surtout à la fin du proestrus, soit peu de temps avant l'ovulation (Freeman, 1994).

Chez le hamster, ces deux hormones sont relâchées quotidiennement avant l'établissement de la maturité sexuelle, puis selon une période de 4 jours, créant ainsi le cycle œstral (Lisk, 1985). Chez la femelle, toutes deux agissent via des récepteurs hautement spécifiques retrouvés au niveau de l'ovaire, surtout par l'entremise d'un messager secondaire, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). À la suite d'une cascade de phosphorylation, les cellules cibles de l'ovaire voient leur taux de sécrétion, de croissance et de prolifération augmenter de façon remarquable. Le taux de sécrétion de ces deux hormones connaît une fluctuation qui est à l'origine de la périodicité du cycle œstral de la femelle (Lisk, 1985). Vers le milieu du proestrus, les taux de sécrétion respectifs de FSH, tout d'abord, et de LH, ensuite, augmentent dramatiquement, pour atteindre un maximum précédant l'ovulation de 6 à 8 heures (Lisk, 1985). Une chute tout aussi brusque s'ensuit, et les taux reviennent à un niveau de base durant la phase d'œstrus du cycle pour ce qui est de la LH, alors que la FSH connaît une deuxième augmentation au tout début de l'œstrus, pour retourner à un niveau basal vers le milieu de la journée d'œstrus (Lisk 1985; Freeman, 1994).

1.8.2- Le cycle œstral du hamster

Par opposition au cycle menstruel de la femme, qui, comme son nom l'indique, est caractérisé par un saignement utérin ayant une période d'environ 28 jours, le cycle de l'activité ovarienne du hamster est qualifié de cycle œstral. Cette distinction s'explique par le fait que l'on utilise la période d'œstrus comme point de repère chez le hamster. L'œstrus se définit comme étant le laps de temps où la femelle accepte l'accouplement avec le mâle et présente un ensemble de réactions physiques ou comportementales caractéristiques, telle que la lordose. L'ovulation se fait pendant l'œstrus, ce qui fait que, par convention, le cycle d'activité ovarienne du hamster débute avec l'ovulation, alors que chez la femme, ce sont les menstruations qui marquent le début du cycle (Driancourt et coll., 1991; Hotchkiss et Knobil, 1994). L'œstrus, qui dure environ 12 heures (Bivin et coll., 1987), inclut l'ovulation, et survient quelques heures après la sécrétion maximale d'œstrogènes et de LH de FSH.

La FSH provoque la croissance accélérée de 6 à 12 follicules primaires mensuellement. En premier lieu, la FSH induit une prolifération rapide des cellules de la granulosa entourant l'ovocyte, ce qui se traduit par la formation de plusieurs couches de ces cellules (Freeman, 1994). De surcroît, la FSH agit aussi sur des cellules interstitielles de l'ovaire, qui s'accumuleront à leur tour en couches englobant les cellules de la granulosa, formant ainsi la thèque. Ces couches de cellules interstitielles se spécialiseront subséquentement pour devenir, d'une part, la thèque interne, sous-couche de type

épithélial qui développera la capacité de sécréter des hormones stéroïdiennes, et, d'autre part, la thèque externe, qui formera une capsule de tissu conjonctif richement vascularisé. Après cette première étape de prolifération, vient en second lieu la sécrétion, par les cellules de la granulosa, du fluide folliculaire, contenant une forte concentration d'œstrogènes. L'accumulation de ce fluide entraîne la formation d'un antra au sein même des couches de cellules de la granulosa (Freeman, 1994).

À partir de cette étape, une croissance fulgurante du follicule dominant se produit. *Primo*, les œstrogènes du fluide folliculaire provoquent la production de récepteurs supplémentaires à la FSH par les cellules de la granulosa, ce qui rend ces dernières encore plus susceptibles à l'action de la FSH. *Secundo*, la FSH et les œstrogènes induisent la synthèse de récepteurs à la LH par les cellules de la granulosa, ce qui rend dès lors celles-ci susceptibles à l'action de la LH. *Tertio*, l'action combinée des œstrogènes et de la LH provoque la prolifération des cellules de la thèque, accompagnée d'une hausse de leur sécrétion (Guyton et Hall, 1996).

La LH joue ensuite un rôle primordial dans l'ovulation. Peu avant l'ovulation, la production de LH par les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse augmente fortement. En plus des effets décrits ci-haut, la LH provoque aussi une réorientation de la synthèse hormonale des cellules de la thèque interne et de la granulosa en favorisant la sécrétion de progestérone au détriment des œstrogènes (Guyton et Hall, 1996). D'un côté, la progestérone provoque le

relâchement d'enzymes protéolytiques de la thèque externe, ce qui se traduit par une fragilisation de la paroi folliculaire; de l'autre, également dans la paroi folliculaire, une importante angiogenèse suivie d'une transsudation vers l'intérieur du follicule, ce qui entraîne une boursoufflure du follicule. Ces deux chaînes d'événement résultent en la rupture du follicule et l'expulsion de l'ovocyte de l'ovaire vers l'oviducte (Freeman, 1994).

Après - et seulement après - l'ovulation, les cellules de la granulosa formant jadis le follicule se transforment sous l'action de la LH en cellules lutéines: c'est la lutéinisation.; Ces nouvelles venues, avec les cellules de la thèque, vont former un amas appelé *corpus luteum*, ou corps jaune. Les cellules lutéines connaissent des phases successives de prolifération, de croissance et de sécrétion, et produisent alors de grandes quantités de progestérone et à peine moindre d'œstrogènes. En absence de grossesse, le *corpus luteum* s'atrophie en *corpus albicans*, ou corps blanc, et perd alors son statut d'organe sécréteur. Il est à noter que chez le rat et autres rongeurs à cycles ovariens courts tel que le hamster, c'est le corps jaune qui est responsable de la production d'un taux suffisant de progestérone préparant l'utérus à la grossesse. L'accouplement induit une production plus élevée de prolactine, qui prolonge la durée de vie active du corps jaune, ce qui permet d'éviter une préparation inopportune de l'utérus en absence d'accouplement (Freeman, 1994).

2. Objectifs de recherche

Bien que la présence d'une glycoprotéine tubaire s'associant à la zone pellucide de l'ovocyte -l'oviductine- soit connue depuis plus de 25 ans, sa contribution au processus global de la fécondation demeure énigmatique.

Afin d'obtenir de nouveaux indices quant au rôle biologique possible des oviductines, en général, et de celle de hamster en particulier, l'équipe du Dr Bleau et moi-même avons décidé d'isoler l'ADNc de l'oviductine de hamster, pour ensuite en déduire la séquence protéique. La recherche de cette dernière avait pour but d'identifier des régions, caractéristiques ou propriétés permettant d'établir des rapprochements avec d'autres protéines, et, si possible, de déduire le rôle biologique de l'oviductine à l'aide de ces similarités. De plus, la connaissance de la séquence de l'ADNc permettait d'envisager un volet d'études axés sur des tests utilisant une oviductine recombinante.

La caractérisation du gène de l'oviductine, et en particulier de la région 5' flanquante, visait quant à elle à identifier des éléments susceptibles d'expliquer sa stricte spécificité tissulaire d'expression tout en poursuivant la récolte d'indices sur son rôle biologique.

3. Matériel et méthodes

3.1- Isolement de l'ADNc de l'oviductine de hamster

3.1.1- Oligonucléotides

Les différents oligonucléotides ont été synthétisés chez Life Technologies (Toronto, Ontario).

VOIR ANNEXE I POUR PLUS DE DÉTAILS

3.1.2- Synthèse de l'ADNc

Les oviductes de sept hamsters choisis au hasard parmi un groupe de femelles présentant un cycle oestral normal furent excisés, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les ARN totaux ont été isolés par la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (1987). Les ARNm poly (A) ont été isolés en utilisant le coffret PolyAtract (Promega, Madison, Wisconsin). Le premier brin d'ADNc a été synthétisé en utilisant la transcriptase inverse Superscript Moloney MuLV (Life Technologies, Mississauga, Ontario) grâce à un oligonucléotide adaptateur NotI; le deuxième brin a été synthétisé tel que décrit ailleurs (Gubbler et Hoffman, 1983). L'ADN polymérase du bactériophage T4 a ensuite servi à compléter l'ADNc. Un pourcent des ADNc ainsi préparés ont subi une ligation aux adaptateurs UNI-Amp (Clontech), suivie d'une purification à l'aide du coffret GeneClean (Bio 101, Vista, Californie) et d'une amplification

par PCR de 30 cycles utilisant les amorces UNI-Amp, aux conditions suivantes: 1 min. à 94°C (dénaturation), 1 min. à 60°C (appariement des amorces), 4 min. à 72°C (synthèse). Le reste des ADNc a servi à la construction d'une banque d'ADNc; pour ce faire, une ligation de 16 h à des oligonucléotides adaptateurs Sall (New England Biolabs, Mississauga, Ontario) a été faite, suivie d'une digestion par l'endonucléase de restriction NotI (2h, 37°C) et d'une purification à l'aide du coffret GeneClean afin d'éliminer le surplus d'oligonucléotides adaptateurs. Les ADNc ont ensuite subi une ligation à des bras de bactériophage λ gt22A préalablement traités aux endonucléases de restriction Sall et NotI (Life Technologies). Le produit de la ligation a ensuite été empaqueté dans des têtes de bactériophages à l'aide d'extraits d'empaquetage Gigapack Gold II (Stratagene, La Jolla, Californie). Les bactériophages résultants ont été titrés ($1,6 \times 10^5$ clones différents) et amplifiés une fois dans la souche *E. Coli* Y1090 (r⁻) (Life Technologies) par culture sur pétris. La banque amplifiée a été élue des pétris et conservée à 4°C en présence de chloroforme.

3.1.3- Isolement d'une sonde d'ADNc spécifique à l'oviductine

Une fraction des ADNc amplifiés a servi de matrice pour une réaction de PCR imbriquée. Les amorces ayant servi à produire le brin sens, OV1S et OV2S, sont des amorces dégénérées dérivées de la séquence amino-terminale connue de l'oviductine de hamster (Malette et Bleau, 1993), tandis que les amorces ayant servi à la synthèse du brin antisens, OV4A et OV6A, sont dérivées d'une région de très haute similarité entre la séquence partielle de l'ADNc de l'oviductine de

babouin (Donnelly, 1991) et la séquence de l'ADNc de l'oviductine bovine (nucléotides 13-34 de l'ADNc de l'oviductine de babouin pour OV4A et 74-92 pour OV6A). Le doublé de réactions de PCR s'est fait dans les mêmes conditions: 3 min. à 94°C (dénaturation initiale), baisse à 80°C pour l'ajout de l'ADN polymérase ("hotstart"), suivi de 30 cycles: 1 min. à 94°C (dénaturation), 2 min. à 45°C (appariement des amorces), 4 min. à 72°C (synthèse). Une bande de 950 pb a ainsi été produite et purifiée par électro-élution d'un gel d'agarose à une membrane NA45 (Schleicher and Schuell, Keene, New-Hampshire), puis clonée dans le vecteur pGEM-T (Promega). Une sonde (sonde A) a été produite à partir de cette construction, en digérant le plasmide résultant par les endonucléases de restriction NotI et Apal, coupant le plasmide de part et d'autre de l'insert dans le site de polyclonage. Le fragment d'intérêt a été purifié par électro-élution d'un gel d'agarose à une membrane NA45, et marqué radioactivement par incorporation de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP à l'aide du coffret T7 Quickprime (Pharmacia Biotech, Montréal, Québec).

3.1.4- Isolement de bactériophages contenant des clones d'ADNc d'oviductine

Des bactéries *E. coli* de souche Y 1090 ont été infectées par 10^5 bactériophages recombinants provenant de la banque amplifiée d'ADNc d'oviductes de hamster, étalées sur des pétris de 23 X 23 cm et cultivées à 42°C pendant 16h. Des membranes de Nylon Magnagraph (MSI, Westboro, Massachusetts) ont été utilisées pour produire, en duplicata, des copies des pétris. Après dénaturation en

milieu alcalin, neutralisation, et fixation de l'ADN grâce à un transfixateur à UV (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, Californie), les membranes ont été pré-hybridées dans une solution aqueuse d'héparine (Ausubel et coll., 1988), puis hybridées pendant 16h en présence de la sonde A dénaturée. Les membranes ont été rincées avec du SSC 2X pendant 30 min. afin d'éliminer l'excès de sonde, lavées à 60°C pendant 1 h dans une solution 0,1 X SSC- 0,1% SDS pour dégager la sonde hybridée de façon non-spécifique, et finalement rincées avec du SSC 0,1X. Les membranes ont été exposées à des films XAR-5 de Kodak, pendant 16h à -80°C, après avoir été préalablement enveloppées dans une pellicule plastique. Vingt clones positifs ont ainsi été identifiés et purifiés jusqu'à unicité par dilutions et hybridations successives. Les clones purifiés ont été amplifiés une fois sur pétris, et l'ADN de chaque insert isolé par PCR.

3.1.5- PCR

L'amplification des clones bactériophagiques d'ADNc a été faite sur 10^4 - 10^5 bactériophages purs dans un volume final de 50 μ L contenant 10 pmoles de chacune des amorces λ gt11 (New England Biolabs) et deux unités d'ADN polymérase Vent (exo^-) (New England Biolabs); le milieu réactionnel a subi les conditions suivantes: 3 min. à 94°C (dénaturation initiale), baisse à 80°C pour l'ajout de l'ADN polymérase ("hotstart"), suivi de 30 cycles: 1 min. à 94°C (dénaturation), 1 min. à 50°C (appariement des amorces), 3 min. à 72°C (synthèse). Les réactions de PCR ont été faites dans un appareil PT-100 (MJ Research, Watertown, Massachusetts).

L'amplification de la région comprenant les répétitions en tandem s'est faite sur des bactériophages purifiés avec les amorces OV12S (sens) et OV12A (antisens) pendant 30 cycles comme ci-haut, mais avec une synthèse de 5 min. L'amplification de la région correspondante de l'ADN génomique s'est également faite tel que décrit ci-haut, sur 1 µg d'ADN génomique, mais en utilisant 2 unités d'ADN polymérase Thermalase Tbr (Amresco, Solon, Ohio).

3.1.6- Séquençage et analyse de séquence

Les clones ou sous-clones d'ADNc dans la série de vecteurs pGEM ont été séquencés, sur chacun des brins, en utilisant le coffret Sequenase 2.0 (U.S. Biochemicals) couplé à l'incorporation de [$\alpha^{35}\text{S}$] dATP, à l'aide des amorces sp6, T7 ou des amorces spécifiques à l'ADNc. La séquence de l'ADNc, telle que publiée par Paquette et coll. (Paquette et coll., 1995), a été déterminée à partir de 3 clones différents. La recherche de séquences présentant des similarités dans la banque de données Genbank a été faite à l'aide des logiciels BLASTN, BLASTP (Altschul et coll., 1990), et PSI-BLAST (Altschul et coll., 1997). Les autres comparaisons ou alignements ont été faits en utilisant le système d'analyse de séquence du University of Wisconsin Genetic Computer Group.

3.1.7- Analyse des ARN

Les ARN totaux de différents organes ont été isolés tel que décrit plus haut. Pour les analyses de buvardage de Northern, 10 µg d'ARN totaux ont été séparés sur un gel d'agarose 1%-formaldéhyde 2,2 M (Sambrook et coll., 1989), transférés sur membrane de Nylon Magnagraph et hybridés pendant 16h à 65°C en présence de la sonde A. La membrane a ensuite été lavée à 60°C, tel que décrit plus haut.

Afin de préparer une sonde d'ARN antisens en vue d'une protection à l'ARNase, un fragment de 260 pb de l'ADNc d'oviductine de hamster, comprenant les nucléotides 697 (site PstI) à 957 inclusivement (amorce OV4A), a été cloné dans le vecteur pGEM-5Zf. Cette construction a été linéarisée par digestion à l'endonucléase de restriction PstI; 1 µg de cet ADN a ensuite été incubé en présence de l'ARN polymérase du bactériophage T7 et 50 µCi de [$\alpha^{32}\text{P}$] UTP pendant 1h à 37 °C, traité à l'ADNase ARNase⁻ (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec) pendant 30 min., purifié à l'aide d'une extraction phénol-chloroforme, et précipité à l'éthanol. La sonde, d'une longueur de 312 bases, comprenait 52 bases du site de multiclonaage du vecteur d'origine. La protection à l'ARNase (Clontech) a été faite selon les instructions du fabricant sur 1 µg d'ARN totaux en présence de 5×10^5 cpm de la sonde antisens, à une température d'hybridation de 45°C pendant 16h et une digestion à l'ARNase à 37°C pendant 30 min.; le complexe bicaténaire d'ARN non-digéré a été précipité à l'éthanol avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide de 6% comprenant 7M d'urée. Après électrophorèse,

le gel a été exposé à un film XAR-5 (Kodak) à la température de la pièce pendant 2h.

3.1.8- Isolement d'ADN génomique de hamster

L'ADN génomique de hamster a été isolé à partir de reins de femelles âgées de 6 à 8 semaines (*Mesocricetus auratus*, Charles River, St-Constant, Québec). Immédiatement après le sacrifice, les reins ont été prélevés, hachés et homogénéisés sur glace à l'aide d'un homogénéisateur manuel de type Potter dans dix volumes de tampon Tris-HCl (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA, pH 8,0, 0.5% SDS) et incubé 1h à 37°C. De la protéinase K a ensuite été ajoutée à une concentration finale de 100 µg/mL, et le tout incubé à 50°C pendant 3h. Trois extractions à l'aide d'un volume de phénol à pH 8,0 saturé en tampon Tris 0,5 M ont été faites pour purifier l'ADN génomique, suivi par une précipitation à l'éthanol/acétate d'ammonium. L'ADN génomique a été récupéré par enroulement autour d'une pipette Pasteur de verre.

3.1.9- Polymorphisme allélique

L'ADN génomique a été isolé d'utérus ou reins de femelles hamsters tel que décrit ailleurs (Sambrook et coll., 1989); 25 µg d'ADN dans un volume de 200 µL ont été digérés avec 50 unités des endonucléases de restriction appropriées, séparés sur gel d'agarose 1% et transférés sur une membrane de Nylon Magnagraph. La sonde B, produit de PCR des amorces OV12S (nt 1218-1233 de l'ADNc) et OV12A (nt 1872-1889 de l'ADNc) sur de l'ADN d'un clone avec 6 répétitions en tandem, a été utilisée; le produit de PCR ci-haut mentionné a été purifié par migration sur gel d'agarose 1% suivi d'une électro-élution sur membrane NA45 et marqué radioactivement à l'aide de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP tel que décrit plus haut. La membrane de Nylon sur laquelle avait été transféré l'ADN génomique digéré et séparé sur gel d'agarose a subi une pré-hybridation de 2 h dans une solution aqueuse d'héparine (voir plus haut), suivi d'une hybridation en présence de la sonde B pendant 16 h à 65°C; finalement, la membrane a été lavée à 60°C tel que décrit précédemment, avant d'être exposée à un film XAR-5 (Kodak).

3.2- Isolement du gène de l'oviductine de hamster

3.2.1- Oligonucléotides

Les différents oligonucléotides ont été synthétisés chez Life Technologies (Toronto, Ontario). Les oligos MCO, AC2J et CP1 ont été synthétisés selon les critères requis pour la méthode d'ETCL-PCR ("End-Trimming Cassette Ligation Polymerase Chain Reaction) (Iwahana et coll., 1994), alors que l'oligo 7AL est dérivé de la séquence de l'ADNc de l'oviductine de hamster (Paquette et coll., 1995). Les oligos G1A0 et G2A sont dérivés de la séquence du clone AvriI, et l'oligo T3L de la séquence du promoteur T3 du bactériophage (λ DASH II) utilisé pour la construction de la banque commerciale d'ADN génomique de hamster (Stratagene, La Jolla, CA).

VOIR ANNEXE I POUR PLUS DE DÉTAILS

3.2.2- Isolement d'ADN génomique de hamster

De l'ADN génomique de rein de hamster femelle a été isolé tel que décrit plus haut.

3.2.3- Estimation de la taille du gène

Des parties aliquotes d'ADN génomique de hamster ont chacun été digérés par 100 unités d'une endonucléase de restriction choisie, dans un volume total de 200 μ L, à la température requise pour chacune des endonucléases. Pour vérifier que la digestion était bel et bien complète, environ 2,5 μ g d'ADN génomique digérés ont été mis sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium; une digestion complète est définie par la présence d'une longue traînée blanche allant de la bande supérieure du marqueur de poids moléculaire au front de migration. Pour le transfert sur membrane de Nylon, une électrophorèse sur gel d'agarose 1% de 2,5 μ g d'ADN génomique digéré a été faite. Suite au transfert, une hybridation avec les sondes phage 19 et OV2S-OV4A (c'est-à-dire les deux fragments d'ADNc couvrant la totalité de l'ADNc de l'oviductine de hamster, respectivement excisées de leur vecteur) marquées radioactivement à l'aide de [α^{32} P] dCTP a été faite dans une solution aqueuse d'héparine, tel que décrit plus haut. La taille du gène de l'oviductine a été évaluée en additionnant, pour chaque puits, la taille approximative de chacune des bandes apparaissant sur l'autoradiogramme.

3.2.4- Isolement de la région 5' flanquante

3.2.4.1- ETCL-PCR

Un premier fragment de la région 5' flanquante a été obtenu par la méthode d'ETCL-PCR, (*End-Trimming Cassette Ligation Polymerase Chain Reaction*) tel qu'initialement décrit par Iwahana et coll. (1994) (VOIR FIG.2). Dans un but de concision, la description qui suit prendra uniquement l'exemple de l'endonucléase de restriction AvrII, mais les endonucléases de restriction BamHI, BclI, BglII, BspEI, NgoAIV, NheI, PstI, SpeI et XmaI ont également été utilisées.

3.2.4.2- Préparation de l'ADN génomique

En bref, de l'ADN génomique de hamster a été digéré par différentes endonucléases de restriction choisies afin de produire des extrémités cohésives compatibles avec la cassette préalablement assemblée (voir plus loin). 5 µg d'ADN génomique ont été digérés par 20 unités de chacune des endonucléases de restriction dans un volume total de 100 µL, à la température requise pendant au moins 3h, jusqu'à digestion complète, tel qu'évalué par observation d'une longue traînée d'ADN après électrophorèse d'une partie aliquote de chacun des échantillons sur gel d'agarose 0,9% coloré au bromure d'éthidium. Dans le cas d'AvrII, il y a ensuite eu remplissage partiel des extrémités produites afin d'assurer une compatibilité parfaite avec la cassette (voir plus bas); 1 µg d'ADN génomique digéré a été traité avec 2,5 unités de Klenow et 0,5 µL de dCTP 10mM dans un volume

total de 30 μL , incubé à 30°C pendant 15 min., suivi d'une inactivation de la Klenow à 75°C pendant 10 min.

3.2.4.3- Assemblage de la cassette

La cassette compatible avec les extrémités cohésives produites par AvrII est formée par l'appariement des deux oligonucléotides complémentaires MCO (*M*ain *C*assette *O*ligonucleotide) et AC2 (*A*daptor *C*assette 2) (VOIR FIG. PRINCIPE ETCL-PCR). L'assemblage se fait en incubant 10 nmoles de chacun des oligos, dans un volume total de 100 μL , à 90°C pendant 3 min., puis en plaçant le tout à 4°C afin de permettre l'appariement des oligos.

3.2.4.4- Ligation des fragments de restriction produits par AvrII à la cassette MCO/AC2J

Pour obtenir un ensemble de fragments de restriction pouvant être utilisés comme matrice pour une réaction de PCR, on procède à la ligation des fragments de restriction partiellement remplis et de la cassette; 500 ng d'ADN génomique préparé sont incubés en présence de 100 pmoles de la cassette MCO/AC2J et de l'ADN ligase du bactériophage T4, dans un volume total de 10 μL , à 16°C pendant 16h.

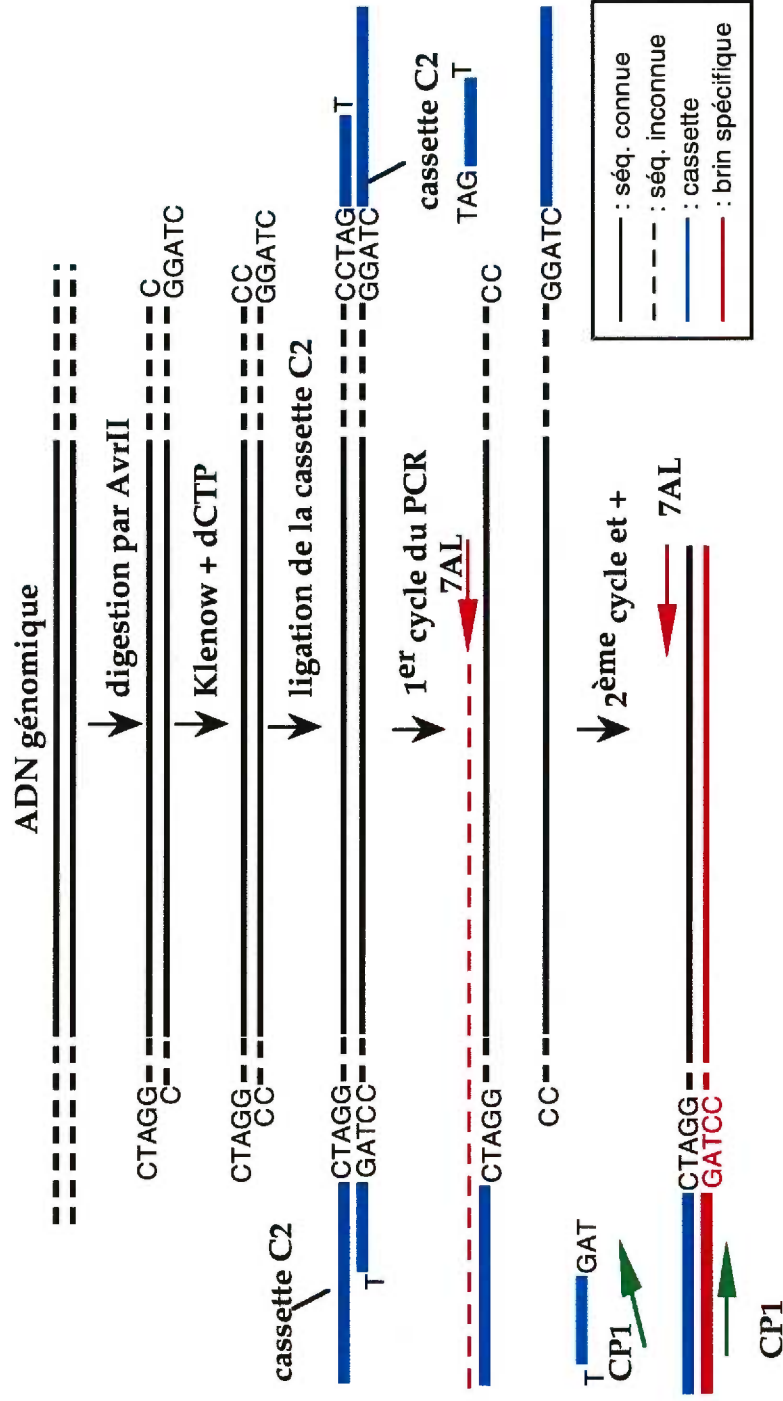


fig. 2: Résumé de la technique d'ETCL-PCR d'Iwahana et coll. (1994). L'exemple présenté utilise l'endonucléase AvrII. Notez, dans la cassette, un mésappariement à l'extrémité 3' de l'oligo le plus court, empêchant ainsi l'utilisation de ce dernier comme amorce pour l'ADN polymérase. La spécificité de l'amplification est assurée au 1er cycle, alors que seule l'amorce spécifique peut engendrer la synthèse d'un produit d'amplification.

3.2.4.5- Amplification par PCR

Une amplification par PCR sur les pools de fragments de restriction produits par les différentes endonucléases de restriction a été faite, en utilisant comme amorce "sens" l'oligo CP1 (*Cassette Primer 1*), ainsi que l'amorce "antisens" 7AL, s'appariant spécifiquement à une portion de l'extrémité 5' de l'ADNc de l'oviductine de hamster, tel que déterminé auparavant (Paquette et coll., 1995)(fig. 2).

Vu la nature de la matrice envisagée pour l'amplification par PCR (ADN génomique), deux précautions ont été respectées visant à assurer la spécificité de l'amplification et la capacité d'obtenir, au besoin, des produits de taille importante. Premièrement, un mélange d'ADN polymérases, Taq et Pwo, a été utilisé (coffret Expand™ Long Template PCR (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec)). L'ADN polymérase Pwo possède une activité de correction de synthèse 3'-5', diminuant ainsi les risques d'insertion d'une base erronée par l'ADN polymérase Taq. Deuxièmement, une combinaison de deux variantes de PCR a été utilisée: la variante "Touchdown PCR" (Hecker et Roux, 1996), consistant à utiliser une température d'appariement initiale supérieure au T_m des amorces et à graduellement diminuer cette dernière de façon à favoriser uniquement les appariements spécifiques entre les amorces et la matrice, et la variante "Extra Long PCR", utilisant un temps de synthèse augmentant à chaque cycle, de façon à permettre la production de fragments de taille importante. Chaque réaction s'est faite dans un volume final de 25 μ L contenant

10 pmoles de chacune des amorces et une unité d'ADN polymérase Expand™ Long Template PCR. Les conditions pour les 20 premiers cycles (Touchdown) ont été: dénaturation initiale à 92°C pendant 60 s, baisse à 80°C pour l'ajout de l'ADN polymérase ("hotstart"), dénaturation à 92°C pendant 10 s, appariement à 72°C - 1°C/cycle pendant 30 s, synthèse à 68°C (selon les recommandations du fabricant) pendant 8 min.; pour les cycles 21 à 40 (*Long Template PCR*) les conditions ont été: dénaturation à 92°C pendant 10 s, appariement à 50°C pendant 30 s, synthèse à 68°C pendant 8 min. + 20 s/cycle. Une extension finale de 60 min. à 68°C a par la suite été faite. Un très court laps de temps alloué à la dénaturation a été utilisé afin de minimiser la dégradation de l'ADN génomique, tel que suggéré par le fabricant du coffret Expand™ Long Template PCR, tandis que le temps de synthèse a été choisi afin de permettre l'obtention de produits de taille importante, également selon les recommandations du fabricant du coffret.

Le produit de l'amplification utilisant les amorces CP1 et 7AL sur le pool de fragments de restriction produits par l'endonucléase de restriction AvrII a été dénommé fragment AvrII. Le produit de PCR a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% suivi d'une électro-élution sur membrane NA 45 (Schleicher & Schuell, Keene, New-Hampshire) et cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega, Madison, Wisconsin). La transformation de la souche bactérienne *E. coli* DH5- α a permis la propagation de la construction.

3.2.4.6- XLPCR

Un deuxième fragment de la région 5' flanquante du gène de l'oviductine a été obtenu de la façon suivante: une amplification par PCR a été faite sur la banque d'ADN génomique commerciale (Stratagene, La Jolla, Californie) afin d'isoler un fragment remontant plus en amont dans la région 5' flanquante. L'oligo T3L a servi d'amorce "sens" et l'oligo G2A, dérivé de la séquence du fragment AvrII, a servi d'amorce "antisens". Le coffret Expand™ Long Template PCR (i.e. XLPCR) a été utilisé sur 1×10^6 bactériophages de la banque. Chaque réaction s'est faite dans un volume final de 25 μ L contenant 10 pmoles de chacune des amorces et une unité d'ADN polymérase Expand™ Long Template PCR, dans les conditions suivantes: dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min., baisse à 80°C pour l'ajout de l'ADN polymérase ("hotstart"), dénaturation à 94°C pendant 1 min., appariement à 50°C pendant 1 min., synthèse à 68°C pendant 3 min., pour un total de 40 cycles. La preuve que le fragment obtenu, dénommé B8, comprend bel et bien une partie de la région 5' flanquante du gène de l'oviductine de hamster a été démontrée par buvardage de Southern et hybridation avec la sonde PRO (voir plus bas), isolée du fragment AvrII. Le produit de PCR B8 a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% suivi d'une électro-élution sur membrane NA45 (Schleicher & Schuell) et cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega). La transformation de la souche bactérienne E. coli DH5- α (Life Technologies) a permis la propagation de la construction.

3.2.5- Isolement du pendant génomique de l'ADNc de l'oviductine de hamster

Le pendant génomique de l'ADNc de l'oviductine de hamster a été isolé sous la forme de six produits de PCR se chevauchant, à l'aide d'amorces synthétisées à partir de la séquence publiée de l'ADNc (Paquette et coll., 1995). Les différents produits de PCR (4SL-8AL, 8SL-10AL0, 9SL0-10AL, 10SL2-5AL, 5SL0-6AL2 et 6S-13A) sont dénommés selon la paire d'amorces ayant servi à les obtenir. Une amplification par PCR a été faite sur 200 µg d'ADN génomique (voir plus haut), en utilisant le coffret Expand™ Long Template PCR. Chaque réaction s'est faite dans un volume final de 25 µL contenant 10 pmoles de chacune des amorces et une unité d'ADN polymérase Expand™ Long Template PCR, dans les conditions suivantes: dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min., baisse à 80°C pour l'ajout de l'ADN polymérase ("hotstart"), dénaturation à 95°C pendant 90 s, appariement à 60°C pendant 1 min., synthèse à 68°C, pour un total de 30 cycles. Un temps de synthèse de 5 min. a été utilisé pour tous les produits, sauf dans le cas du produit 5SL0-6AL2, qui fut de 10 min. Les différents produits de PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% à l'aide du coffret QIAEXII de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Ontario) et clonés dans le vecteur pGEM-T_{easy} (produits 4SL-8AL, 8SL-10AL0, 9SL0-10AL, 10SL2-5AL and 5SL0-6AL2) ou pGEM-T (produit 6S-13A) (Promega). La transformation de la souche bactérienne *E. coli* DH5- α (Life Technologies) a permis la propagation des constructions.

3.2.6- Séquençage et analyse de séquence

Les clones d'intérêt ont été séquencés selon la méthode de Sanger (1977), à l'aide d'un coffret Sequenase 2.0 (United States Biochemicals, Cleveland, Ohio), ou par séquençage automatisé à l'aide d'un appareil ABI 373A Stretch XL. Les amorces sp6 et T7 ont d'abord été utilisées. Des amorces spécifiques ont été synthétisées au fur et à mesure, afin de progresser dans la séquence des produits de PCR, et ce sur les deux brins à la fois. L'ensemble de la région 5' flanquante a été séquencé au moins deux fois. Les jonctions exon/intron ont été déterminées par comparaison de la séquence génomique avec la séquence connue de l'ADNc (Paquette et coll., 1995, Genbank U15048), de même qu'en tenant compte de la taille et disposition des exons chez l'homologue humain de l'oviductine (R. C. Jaffe, travaux non-publiés, Genbank U58001-U58009). Les comparaisons et analyses de séquence ont été faites avec le système d'analyse de séquence du University of Wisconsin Genetic Computer Group (UWGCG), version 9.1. (Madison, Wisconsin).

3.2.7- Détermination du site d'initiation de la transcription

Les ARN totaux ont été isolés de 10 oviductes (congelés dans de l'azote liquide) prélevés de hamsters ayant atteint leur maturité sexuelle, à l'aide d'un coffret RNeasy minikit de Qiagen, selon les recommandations du fabricant. Les oviductes ont été rassemblés pour l'homogénéisation, puis le mélange a été divisé en dix parties aliquotes. L'intégrité des ARN totaux ainsi obtenus a été confirmée par

observation des ARN ribosomiaux 18S et 28S après électrophorèse d'un échantillon de 10 µg de chacune des parties aliquotes sur gel d'agarose 1,2%-formaldéhyde 0,2 M. Quatre extensions de l'amorce ont été faites sur des parties aliquotes différentes à partir de 17 à 23 µg d'ARN totaux d'oviductes, tel que décrit ailleurs (Ausubel et coll., 1988). L'oligo G1A0, dérivé de la séquence du produit AvrII (voir plus bas), a été choisi pour remplir le rôle de l'amorce devant servir à l'extension, étant donné qu'il s'apparie au brin sens dans une région comprise dans le premier exon. Le résultat de l'extension de l'amorce a été analysé sur gel de polyacrylamide 6% de 0,4 mm d'épaisseur, en utilisant l'oligo G1A0 sur le plasmide pB8 comme séquençage de référence.

3.2.8- Plasmides et sondes

Les constructions comprenant les différents produits de PCR sont dénommées p(nom du produit de PCR) (e.g.: pB8, p4SL-8AL, etc.).

La sonde PRO a été obtenue en digérant pAvrII avec les endonucléases de restriction NcoI et BamHI et en purifiant le fragment de 263 pb résultant; ce fragment a été marqué radioactivement avec du [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP en utilisant le coffret T7 Quickprime (Pharmacia, Biotech, Baie d'Urfé, Québec)

3.2.9- Buvardage de Southern et hybridation

Plusieurs produits de PCR ont été obtenus avec les amorces T3L et G2A; les produits, après électrophorèse sur gel d'agarose, ont été transférés sur membrane de Nylon Qiabrane non-chargées (Qiagen, Mississauga, Ontario), d'après un protocole reconnu (Ausubel et al., 1988). Les étapes de pré-hybridation et hybridation ont eu lieu dans une solution aqueuse d'héparine (100 µg/mL), à base de tampon STE 4X (composé de Tris-HCL 10 mM, pH 7,5, NaCl 10mM, EDTA 1mM), SDS 0,2% et pyrophosphate de sodium (NaPP) 0,1% à 65°C pendant 16h. La sonde PRO marquée radioactivement a été ajoutée à une solution fraîche d'héparine à 1×10^6 cpm/mL. L'hybridation a été faite à 65°C pendant 16 h. La membrane a ensuite été rincée brièvement avec du tampon SSC 2X (NaCl 0,15 M, citrate de sodium 0,015 M, pH 7,0) afin d'enlever l'excès de sonde radioactive, lavée à l'aide de tampon SSC 0,1X contenant 0,1 % de SDS à 60°C pendant 1 h pour enlever la sonde hybridée de façon non-spécifique, et relavée à l'aide de tampon SSC 0,1X afin d'éliminer toute trace de SDS. La membrane a par la suite été enveloppée dans une pellicule plastique avant d'être exposée à un film Reflection NEF (Dupont-NEN, Montréal, Québec) à température ambiante jusqu'à obtention d'un signal d'intensité satisfaisante. La comparaison des autoradiogrammes avec des copies du gel d'agarose a permis d'isoler un seul produit spécifique de 2,8 kb.

4. Résultats

4.1 Caractérisation de l'ADNc de l'oviductine de hamster

4.1.1- Clonage et séquençage de l'ADNc

Le premier fragment de l'ADNc de l'oviductine de hamster a été obtenu par une amplification par PCR imbriqué sur une banque d'ADNc d'oviductes de hamster, à l'aide, d'une part, d'amorces "sens" dégénérées dérivées de la séquence amino-terminale connue de l'oviductine mature et sécrétée, et, d'autre part, d'amorces "antisens" dérivées d'une région de très haute similarité entre les séquences connues des ADNc d'oviductine bovine et de babouin (Donnelly et coll., 1991). Le produit servant de référence, tel que décrit dans l'article de Paquette et coll., (1995), a été obtenu en premier lieu avec la combinaison de l'amorce dégénérée OV1S et de l'amorce OV6A, suivi, en second lieu, d'une amplification imbriquée faite à l'aide de l'amorce dégénérée OV2S et de l'amorce OV4A, et a une taille de 950 paires de bases (pb); la région de l'ADNc correspondant à la région 5' non-traduite de l'ARNm, de même que la région de l'ADNc correspondant à la région de l'ARNm encodant le peptide signal se trouvaient exclues du produit de PCR obtenu. Après clonage dans un vecteur pGEM-T, l'insert de plusieurs clones différents a été séquençé, ce qui a permis de certifier qu'il s'agissait bien d'oviductine, par comparaison, *primo*, avec la séquence amino-terminale connue se trouvant en aval de la région ayant servi à produire les deux amorces

dégénérées, et, *secundo*, avec la séquence d'ADNc connue de l'oviductine bovine (Sendai et coll., 1994).

Ce produit de 950 pb, que je dénommerai OV2S-OV4A pour la suite, a ensuite servi de sonde afin d'isoler le reste de l'ADNc de l'oviductine de hamster par criblage de la banque d'ADNc d'oviducte de hamster. L'un des clones positifs résultant de ce criblage, appelé bactériophage 19, possédait un insert de près de 2 kb, qui a été isolé par amplification par PCR, en utilisant des amorces s'appariant à chacun des bras de bactériophage utilisés pour la construction de la banque. Le produit de cette amplification a été cloné dans le vecteur pGEM-T. La séquence de l'insert a été obtenue à l'aide de trois clones différents, en progressant dans la séquence à l'aide d'amorces spécifiques, ou bien en sous-clonant des fragments de restriction de l'insert et en les séquençant à l'aide d'amorces s'appariant au vecteur utilisé. La taille exacte de cet insert s'est révélée être de 1832 pb, et comprenait la partie 3' manquante de l'ADNc, en plus d'une région de 506 pb chevauchant le produit OV2S-OV4A (fig. 3).

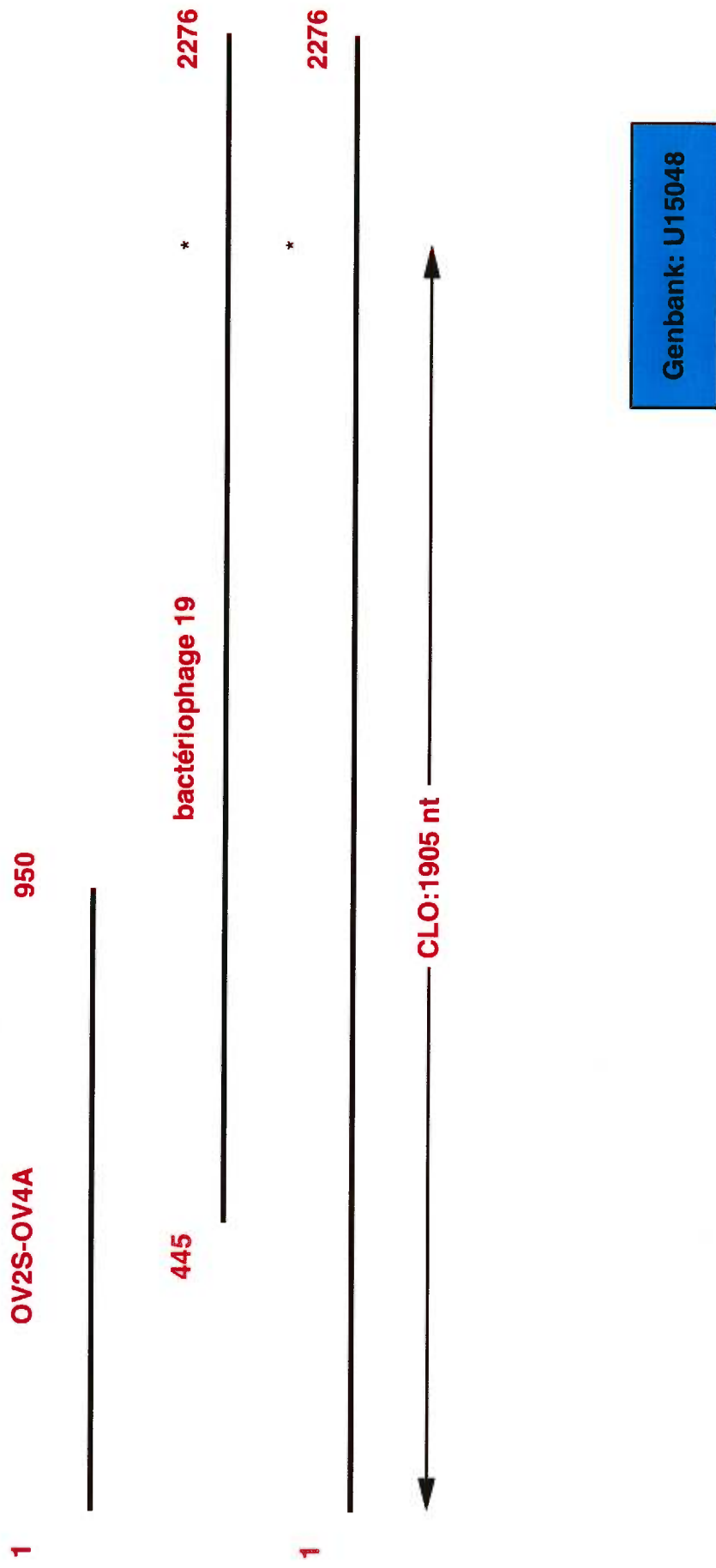


fig. 3: Clonage de l'oviductine de hamster. Les portions de l'ADNc contenues dans le produit OV2S-OV4A et le bactériophage 19 sont présentées, de même que la séquence résultante de 1905 nt est présent et résulte en un peptide de 635 acides aminés. La séquence résultante de l'ADNc de l'oviductine de hamster porte le no. de référence Genbank U15048.

4.1.2- Analyse de la séquence de l'ADNc de la séquence peptidique déduite

La séquence résultante de ces deux fragments de l'ADNc de l'oviductine de hamster comprend donc un total de 2276 pb, excluant les régions correspondant à la région 5' non-traduite ainsi qu'à la région encodant le peptide signal, alors que l'ARNm a, lui, une taille avoisinant les 2,4 kb (Paquette et coll., 1995). Cet ADNc comprend un cadre de lecture ouverte de 1905 pb, encodant la totalité du peptide de l'oviductine mature sécrétée. Précisons que certaines erreurs de lectures lors de séquençages précédents ont été corrigées par rapport à la séquence soumise telle que rapporté par Paquette et coll. (1995). Le polypeptide contient 635 acides aminés (a.a.) et a une masse déduite de 69358 daltons (Da) (fig. 4), alors que la protéine mature et sécrétée possède une masse apparente de 160-210 kDa (Malette et Bleau, 1993). Un examen plus poussé de la séquence de l'ADNc révèle la présence de six répétitions en tandem presque identiques de 45 nucléotides (nt), qui se transposent au niveau de la séquence peptidique déduite en six répétitions en tandem de 15 a.a. Cinq de ces six répétitions de 15 a.a. comprennent un site potentiel de N-glycosylation, tandis que deux autres sites potentiels sont situés en amont, pour un total de sept. Il est à noter que ces répétitions de 15 a.a. sont composées d'une forte proportion des résidus sérine (S), thréonine (T) et proline (P). La séquence résultante de l'ADNc codant pour la protéine sécrétée est disponible dans la banque de séquence Genbank sous le numéro U15048 (fig. 4). L'importante différence entre la masse moléculaire calculée du polypeptide déduit (environ 70

kDa) et la masse moléculaire de la protéine mature et sécrétée, telle que déterminée par SDS-PAGE (160-210 kDa), permet de déduire que la protéine mature et sécrétée porte un nombre important de groupements glycosylés; le nombre restreint de sites potentiels de N-glycosylation permet de conclure que ce sont surtout les sucres O-liés qui sont responsables de cette différence de masse.

YKLVCYFTINWAHSRPPVPAIILPRDLLDPFLCTHLIFAFASMSNNQIVANNLQDEKILYPEF
 NKLKERNRALIKTLLSVGGWNFGTSRFTTMLSTLASREKFIGSVVSFLRTHGFDGLDLFFL
YPGLRGSP INDRWNFLFLIEELQFAFEKEALLTQRPRLLLSAAVSGIPYIIQTSYDVHLL
 GRRLDF INVLSYDLHGSWEKSTGHNSPLFSLPEDPKSSAFAMNYWRNLGAPADKLLMGFP
 AYGRTFHLLRESKNGLQAASMGPASPGKYTKQAGFLAYYEVCSFIQRAEKHWIDHQYVPY
 AYKKEWVGYYDDAVSFSYKAMFVKKEHFGGAMVWTLDMDDVRGTFCNGGPFPLVHILLNEL
 LVRAEFNSTIPLPQFWFTLPVNSSGGPGESESLPAATEELTTDTVKILPPGGEAMATEVHRKYE
 KVTTI PNGGFVTPAGTTSPTTHAVALERNAMAPGAKTTTSLDLLSETMTGMTVIVTQTQTA
GREITMTTVGNQSVTPGGEITMTTVGNQSVTPGGEITMTTVGNQSVTPGGEITMTTVGNQSVTP
VGETVTVTVGNKSVTPGGQTTATVGSQSVTPPGMDTTLVYLQTMTLSEKGTSSKKAVVLEK
 VTVPPREISVMPNEQNTALNRENLIAEVESYSDG*

fig. 4: Séquence peptidique déduite de l'ADNc de l'oviductine de hamster. La séquence, correspondant à la séquence peptidique de la protéine mature sécrétée à 6 répétitions, a été corrigée de façon à éliminer les erreurs de séquençage initiales. Les 4 résidus cystéines conservés sont en vert. Les sites potentiels de N-glycosylation sont soulignés, et les répétitions en tandem sont en rouge et bleu. La séquence incluant la région similaire au site actif des chitinases est en rose (voir fig. 6). Le codon stop est représenté par une astérisque.

4.1.3- Recherche de protéines similaires dans les banques de données

4.1.3.1- Homologues de l'oviductine de hamster

La comparaison de la séquence peptidique de l'oviductine de hamster avec celle des autres oviductines connues révèle un degré de conservation relativement élevé d'une espèce à l'autre, soit un peu plus de 70% d'identité pour la plupart des espèces, et 78% avec l'oviductine murine (tableau I). C'est surtout la moitié amino-terminale qui présente un taux de similarité très élevé. La moitié carboxy-terminale des oviductines est nettement plus riche en résidus P, T et S que la partie amino-terminale. Les huit séquences peptidiques complètes disponibles (la séquence de l'oviductine du macaque bonnet chinois étant partielle), présentent une conservation parfaite de quatre résidus cystéines (Ca.a.) (fig. 5).

Espèce	ARNm (kb)	Peptide (a.a.)	Similitude (%)	Références
hamster	2,4; 2,5	656,671	100	U15048
		671		D32218
souris	2,8	721	78,0	D32137
humain	2,4	654	77,9	U09550
babouin	2,8	623	76,7	M59903
rhésus	2,4	624	76,2	U87259
porcin	2,25	527	73,7	U43490
bovin	2,5	519	71,6	D16639
ovin	2,2	539	70,2	U16719
	2,4	531		U17988
macaque	-	126	85,7	AF132215
bon. chi.				

Tableau I: Comparaison des ADNc des diverses oviductines, ainsi que de la taille du peptide déduit. La taille des ARNm est telle qu'évaluée par buvardage de Northern. Les deux allèles de l'oviductine de hamster sont présentés, mais les allèles supplémentaires identifiés par Lapensée et coll. (1997) pour l'oviductine humaine ne sont pas présentés. Les taux de similitude sont calculés à l'aide du logiciel GAP du système d'analyse de séquence du UWGCG par comparaison avec l'oviductine de hamster de 656 a.a. (U15048). La séquence de l'oviductine de macaque bonnet chinois est partielle. Les numéros de références de Genbank inclus sont ceux des séquences desquelles les informations ont été tirées.

fig. 5 (pages suivantes): Alignement des séquences peptidiques des diverses oviductines. Notez que la séquence peptidique de l'oviductine de hamster comprend le peptide signal, dont la région correspondante de l'ARNm n'était pas incluse dans l'ADNc. Les séquences sont classées par ordre décroissant de similitude avec l'oviductine de hamster. Le consensus a été établi par le logiciel PILEUP et l'alignement par PRETTY et tient compte des identités retrouvées dans 8 des 9 séquences, afin d'amoinrir l'effet produit par la séquence partielle de l'oviductine de macaque bonnet chinois. Les 4 résidus cystéines conservés sont en bleu. Numéros de références de Genbank: hamster: U15048, souris: D32137, humain: U09550, rhésus: U87259, porcin: U43490, bovin: D16639, ovin: U16719, macaque bonnet chinois: AF132215.

hamster MGRLLLVWGLVLLMK PNDGTAYKLV**CY**FYFTN WAHSRPPASILPRD LDPFFL**C**THLIFAFAS MSNNQIVANMLQDEK ILYPEFNKLIKERNRE
 souris MGRLLLAGLVLLMK HSDGTAYKLV**CY**FYFTN WAHSRPPASIMPHD LDPFFL**C**THLIFAFAS MSNNQIVAKNLQDEN VLYPEFNKLIKERNRE
 humain MWKLLLVWGLVLLVK HHDGAAHKLV**CY**FYFTN WAHSRPPASILPHD LDPFFL**C**THLIFAFAS MNNNQIVAKDLQDEK ILYPEFNKLIKERNRE
 babouin MWKLLLVWGLVLLVK HHDGAAHKLV**CY**FYFTN WAHSRPPASILPHD LDPFFL**C**THLIFAFAS MNNNQIVAKDLQDEK ILYPEFNKLIKERNRE
 rhésus MWKLLLVWGLVLLVK HHDGAAHKLV**CY**FYFTN WAHSRPPASILPHD LDPFFL**C**THLIFAFAS MNNNQIVAKDLQDEK ILYPEFNKLIKERNRE
 porcine MGKLLLVWGLVLLVK HHDGAAHKLV**CY**FYFTN WAFSRPPASILPRD LDPFFL**C**THLIFAFAS MNDSQIVAKDARDES IFYPEFNQLIKERNRE
 bovin ~~~~LLLCVGLLLLVK HHDGAAHKLV**CY**FYFTN WAFSRPPASILPRD LDPFFL**C**THLIFAFAS MSNNQIVPKDPQDEK ILYPEFNKLIKERNRG
 ovin ~~~~L-L-L-VL-K HHDGAAHKLV**CY**FYFTN WAFSRPPASILPRD LDPFFL**C**THLIFAFAS MNNNQIVPKDPLDEK ILYPEFNKLIKERNRG
 mac. bonnet chi. ~~~~VHMLK HHDGAAHKLV**CY**FYFTN WAHSRPPASILPHD VDPFF**C**THLIFAFAS MNNNQIVAKDLQDEK ILYPEFNKLIKERNRE
Consensus ~~~~L-L--K H-DG-A-KLV**CY**FYFTN WA-SRPPASILP-D LDPFL**C**THL-FAFAS M-NNQIV-K---DE- ILYPEFNKLIKERNR-

hamster LKTLLSVGGWVFGTS RFTTMLSTLASREKF IGSVVSFLRTHGFDG LDLFFLYPGLRGSP I NDRWNFLFLIEELQF AFEKEALLTQPRLL
 souris LKTLLSIGGWVFGTS RFTTMLSTLANREKF IDSVISFLRIHGFDG LDLFFLYPGLRGSP HDWVNFVFLIEELQF AFEREALLTQHPRL
 humain LKTLLSIGGWVFGTS RFTTMLSTFANREKF IASVISLRLTHDFDG LDLLFFLYPGLRGSP HDWVNFVFLIEELQF AFRKEALLTMRPRL
 babouin LKTLLSIGGWVFGTS RFTTMLSTFANREKF IASVISLRLTHDFDG LDLLFFLYPGLRGSP HDWVNFVFLIEELQF AFRKEALLTMRPRL
 rhésus LKTLLSIGGWVFGTS RFTTMLSTFANREKF IASVISLRLTHDFDG LDLLFFLYPGLRGSP HDWVNFVFLIEELQF AFRKEALLTMRPRL
 porcine LKTLLSIGGWVFGTS RFTTMLSTFTNREKF IRSAIGLLRTHGFDG LDLLFFLYPGLRGSP RDRWNFLFLIEELQ AFREAQLTMRPRL
 bovin LKTLLSIGGWVFGTV RFTTMLSTFTNREKF VSSVIALLRTHGFDG LDLLFFLYPGLRGSPA RDRWTFVFLIEELQ AFKNEAQLTMRPRL
 ovin LKTLLSIGGWVFGTS RFTTMLSTFTNREKF VNSVIALLRTHGFDG LDLLFFLYPGLRGSPA RDRWTFVFLIEELQ AFKNEAQLTMRPRL
 mac. bonnet chi. LKTLLSIGGWVFGTS RFTTMLSTFANREKF IASVIALLRTHDFDG L~~~~~
Consensus LKTLLS-GGWVFGTS RFT-MLST--NRE-F --SVI--LR-H-FDG LDLLFFLYPGLRGSP--DRW-F-FL-EEL--AF--EA-LT--PRLL

hamster LSAAVSGIPYIIQTS YDVHLLGRRLLDFINV LSYDLHGSWEKSTGH NSPLFSLPEDPKSSA FAMVYWRNLGAPADK LLMGFPAYGRTFTHLL
 souris LSAAVSGIPSIHTS YDALLLGRRLDFINV LSYDLHGSWEKFTGH NSPLFSLPEDSKSSA YAMVYWRKLGTPADK LIMGFPTYGRNFYLL
 humain LSAAVSGVPHIVQTS YDVRFLGRLLDFINV LSYDLHGSWERFTGH NSPLFSLPEDPKSSA YAMVYWRKLGAPSEK LIMGIPTYGRTFRLL
 babouin LSAAVSGVPHIVQTS YDVRFLGRLLDFINV LSYDLHGSWEKFTGH NSPLFSLPEDPKSSA YAMVYWRKLGAPSEK LIMGIPTYGRTFRLL
 rhésus LSAAVSGVPHIVQTS YDVRFLGRLLDFINV LSYDLHGSWEKFTGH NSPLFSLPEDPKSSA YAMVYWRKLGAPSEK LIMGIPTYGRTFRLL
 porcine LSAAVSADPHIVQKA YDVRLLGRLLDFINV LSYDLHGSWEKVTGH NSPLFSLSDDDPKSSA YTMVYWRKLGAPPEK LLMGFPTYGRTFRLL
 bovin LSAAVSGDPHVQKA YEARLLGRLLDFISV LSYDLHGSWEKVTGH NSPLFSLPGDPKSSA YAMVYWRQLGVPPEK LLMGLPTYGRTFTHLL
 ovin LSAAVSGDPHVQKA YDARLLGRLLDFISV LSYDLHGSWEKVTGH NSPLFSLPGDPKSSA YAMS YWRQLGVPPEK LLMGLPTYGRTFTHLL
 mac. bonnet chi. ~~~~Y-----LGR-LDFI-V LSYDLHGSWE--TGH NSPLFSL--D-KSSA --M-YWR-LG-P--K L-MG-P-YGR-F-L
Consensus LSAAVS--P-----Y-----LGR-LDFI-V LSYDLHGSWE--TGH NSPLFSL--D-KSSA --M-YWR-LG-P--K L-MG-P-YGR-F-L

271

360

hamster
souris
humain
babouin
rhésus
porcin
bovin
ovin
mac. bonnet chi.

RESKNGLQAASMGPA SPGKYTKQAGFLAYY EVCSFIQRAEKHWID HQYVPYAYKGEWVG YDDAVSFYKAMFVK KEHFGGAMVWTLDM
KESKNGLQATASMGPA SPGKYTKQAGFLAYY EVCSFVQRAKHHWID YQYVPYAFKGEWLG YDDTISFSYKAMYVK REHFGGAMVWTLDM
KASKNGLQARAIGPA SPGKYTKQAGFLAYF EICSFVWGAKKHWID YQYVPYANKGEWVG YDNAISFSYKAWFIR REHFGGAMVWTLDM
KASKNGLQATAIGPA SPGKYTKQAGFLAYF EICSFVWGAKKHWID YQYVPYANKGEWVG YDDAISFSYKAWFIR REHFGGAMVWTLDM
KASKNGLQATAVGPA SPGKYTKQAGFLAYF EICSFVWGAKKHWID YQYVPYANKGEWVG YDDAISFSYKAWFIR REHFGGAMVWTLDM
KASKNELGAEAVGPA SPGKYTKQAGFLAYY EVCSFVQRAKRWID HQYVPYAYRGEWVG YDDDISFSYKAWFIR KEHFGGAMVWTLDL
KASQNELRAQAVGPA SPGKYTKQAGFLAYY EICCFVRRAKRWIN DQYVPYAFKGEWVG YDDAISFSYKAWFIR REHFGGAMVWTLDL
RASQNELGAGAVGPA SPGKYTKQAGFLAYY EVCSFVQRAKRWIN DQYVPYAFKGEWVG YDDAISFSYKAWFIR REHFGGAMVWTLDL
~~~~~  
--S-N-L-----GPA SPGKYTKQ-GFLAY- E-C-F--A-K-WI- -QYVPYA--GKEM-G YD--SF-YKA--- -EHFGGAMVWTL-D

Consensus

361

450

hamster  
souris  
humain  
babouin  
rhésus  
porcin  
bovin  
ovin  
mac. bonnet chi.

DVRGTFCGNGPFPPLV HILNELLVRAEFNST PLPQFWFTLPVNSSG PGSESLPATEELTTD TVKILPPGGEAMATE VHRKYEKVTTIPNGG  
DVRGTFCGNGPFPPLV HILNELLVQTESNST PLPQFWFTSSVNASG PGSENTALTEVLTTD TIKILPPGGEAMTTE VHRRYENMTTVPSDG  
DVRGTFCGTGPFPLV YVLNDILVRAEFSST SLPQFWLSSAVNSS TDPERLAVTTAWTTD .SKILPPGGEAGVTE IHGKCNMTITPRGT  
DVRGTFCGTGPFPLV YVMNDILVRAEFSST SLPQFWLSSAVNSS TDPERLAVTKAWTTD .IKILPPGGEAGVTE IHGKCNMTITPRVT  
DVRGTFCGTGPFPLV YVLNDILVRAEFSST SLPQFWLSSAVNSS TEPELAVTKAWTTD .IKILPPGGEAGVTE IHGKCNMTITPRVT  
DVRGTFCGTGPFPLV YMLNDLLLKAEVSSST LSPGFGLSTTVNSSR TCPELAVTKDLTTD .LGILPLGGEAVATE THGRSDNMVTPGGG  
DFRGYFCGTGPFPLV HTLNMLLVNDEFSSST PSPKFWFSTAVNSSR IGPEMPTMTRDLTTG .LGILPPGGEAVATE THRKSETMTITPKGE  
DFRGNFCGTGPFPLV HTLNMLLVNDEFSSST PSPKFWFSTAVNSSR IGPEMPTMTRDLTTG .LGILPLGGEAVATE THRKSATMTTTPRGE  
~~~~~  
D--G-F-C-G-GPFPPLV --N-L--E--ST --P-F-----VN-S-- --E-----T-----TT-- --ILP-GGEA--TE -----T--P---

Consensus

451

540

hamster
souris
humain
babouin
rhésus
porcin
bovin
ovin
mac. bonnet chi.

FVTPA.GTTSPTTHA VALERNAMAPGAKTT TSLDLLSETMTGMTV T.....VVQQTAG.REITM
SVTPG.GTASPRKHA VTPENNTMAAEAKTM STLDFFSKTTTGVSKT TTTGISKTTTGVSKT TTGVSKATAGISKTI PEISKAT...AGVS
TVTPKTEVSLGKHT VALGEKTEITGAMTM TSVGHQSMTPGEKA.L TPVGHQSVTTGQKTL TSVGYQSVT.PGEKT
IVTPKTEVSLGKHT VALGEKTEITGATTM TSVGHQSMTPGEKAL TPVGHQSVTTGQKTL TPVGHQSVTTGQKTL ISVGYHSVT.PGEKT
IVTPKTEVSLGKHT VALGEKTEITGATTM TSVGHPSPMTPGEKAL TPVGHQSVTTGQKTL TPVGHQSVTTGQKTL ISVGYHSVT.PGEKT
LVAPTRPTLSFGKLT VAPEGKTESPGEKAM TPVGHQSVTTGQKTL TPVGHQSVTTGQKTL TPVGHQSVTTGQKTL PS.GKRS
IATPRTPLSFGRHT AAPEGKTESPGEKPL TTVGHLAVSPGGIAV GPVRLQT...GQKV TTPGRKAGVPEKVTT PS.GKMTVTPDGRAE
TATPRTPLSSGRRT AAPEGKTESPGEKPL TSVGHLAVSPGGIAV GPVHLQI...GQKV TTPGRKAGVPEKVTT PS.GKMTVTPDGRAE
~~~~~  
--P-----S-----T-----

Consensus

541 hamster .TTVGNQSVTPG... .GETMTTVGNQSV TPG..... .GETMTTVGNQSVTP VGETVTIV.....GN  
souris KTTTGVSKTTTGISK TITGVSKTTTGISK TITGVSKTTTGISKTTT TGVSKTTTGISKTTT GISQTTTGISKTTT ISKTTTGISKTTPGI  
humain LTPVGHQSVTPVSHQ SVSPGGTMTTPVHFQ TETLRQNTVAPRKA VAREKVTVPSRNISV TPEGQTMPLRGENLT SEVGTHTPRMGNLGLQ  
babouin LTPVGHPSVTPVSHQ SVSPGGMTMTTPVHFQ TETLRQNTMAPRKA VAHEKVTVPSRKISV TPEGQTVPLRGEYLT SETGTHPQDG~  
rhésus LTPVDHPSVTPVSHQ SVSPGGMTMTTPVHFQ TETLRQNTMAPRKA VAREKVTVPSRKISV TPEGQTVPLRGEYLT SETGTHPQGG~  
porcin TLERRL~  
bovin TLERRL~  
ovin TLERRL~  
mac. bonnet chi. ~  
Conensus -----

631 hamster KSVTPG..... .GQTTATVGSQSVT PPGMDTTLVYLQTM LSEKGTSSKKA VLE KVTVPPREISVMPNE QNTALRENLIAEVE  
souris SKTTPGMTVIVQTOA NEAETTATMDHQSVT PTEMDTTLFYLKTM PSEKETSRRKTMVLE KATVSPREMSATPNG QSKTLK WASLITEVE  
humain MEAENRMLSSSPVI QLPEQTPIAFDNR FV PIYGNHSSVNSVTPQ TSPLSLKKEIPENSA VDEEA~  
babouin ~  
rhésus ~  
porcin ~  
bovin ~  
ovin ~  
mac. bonnet chi. ~  
Conensus -----

721 hamster SYSQDG  
souris TYSQDG  
humain ~  
babouin ~  
rhésus ~  
porcin ~  
bovin ~  
ovin ~  
mac. bonnet chi. ~  
Conensus -----

#### 4.1.3.2- Chitinases et protéines apparentées aux chitinases

La comparaison de la séquence peptidique avec les séquences de la banque de données Genbank a démontré l'existence d'autres protéines partageant un certain taux de similarité avec l'oviductine. C'est par la partie amino-terminale de leur séquence que ces protéines s'apparentent à l'oviductine de hamster. Ces protéines peuvent être classées en deux groupes distincts; l'un est une famille de protéine, les chitinases (aussi connues sous le nom de 18 glycosyle hydrolases (Henrissat, 1991)), et l'autre comprend un ensemble de protéines ressemblant par leur séquence peptidique aux chitinases, mais ne possédant apparemment pas l'activité hydrolytique des chitinases, vu qu'il leur manque un résidu considéré indispensable à l'activité catalytique (Watanabe et coll., 1993) (fig. 6).



| Famille de protéine  | Espèce               | Site actif          |
|----------------------|----------------------|---------------------|
| Oviductines          | hamster              | LRTHGFDGLDLFFLYPG   |
|                      | souris               | LRIHGFDGLDLFFLYPG   |
|                      | humain               | LRTHDFDGLDLFFLYPG   |
|                      | babouin              | LRTHDFDGLDLFFLYPG   |
|                      | rhésus               | LRIHDFDGLDLFFLYPG   |
|                      | porc                 | LRTHGFDGLDLFFLYPG   |
|                      | boeuf                | LRTHGFDGLDLFFLYPG   |
|                      | mouton               | LRTHGFDGLDLFFLYPG   |
|                      |                      | LR-H-FDGLDLFFLYPG   |
| YKL-40               | humain (=CHI3L1)     | LRTHGFDGLDLAWLYPG   |
|                      | souris               | LRSYGFDGLDLAWLYPR   |
|                      | rat                  | LRTYGFDGLDLAWLYPG   |
|                      | porc                 | LRTHGFDGLDLAWISPG   |
|                      | boeuf                | LRTHGFDGLDLAWLYPG   |
| YKL-39               | humain               | LRNHNFDGLDVSWIYPD   |
| Ym1                  | souris               | LRQYNFDGLNLDWQYPG   |
| précurseur chit.     | humain               | LRNHNFDGLDVSWIYPD   |
|                      |                      | LR---FDGL---W--P-   |
| Chitinase            |                      |                     |
| chitotriosidase      | humain               | LRKYSFDGLDLWWEYYPG  |
| chitinase pulmonaire | humain               | LRQYEFDGLDFDWEYYPG  |
| chitinase suspectée  | souris               | LRQYGF DGLDLWWEYYPG |
|                      | <i>S. cerevisiae</i> | FDSAVVDGFDIENNN     |
|                      | <i>S. marcescens</i> | MKDYGF DGVDAWEYP.   |
|                      | <i>Brugia malayi</i> | LRKNNFDGFDLDWEYYPV  |
|                      | <i>Chelonus</i>      | LQQYQFDGFDIDWEYPA   |
|                      |                      | -----FDG-D--WE----  |
|                      |                      | -----FDG-----       |

fig. 6: Alignement des séquences peptidiques des oviductines, de protéines apparentées aux chitinases (PAC) et de quelques chitinases. La séquence choisie est celle correspondant au site actif des chitinases. Pour chaque groupe de protéines, la séquence consensus, en rouge, a été établie par le logiciel PILEUP. Le consensus global est en noir. Les résidus cruciaux pour l'activité chitinolytique sont indiqués en bleu. Notez que les oviductines et les PAC ne possèdent pas le deuxième résidu crucial (E), correspondant au résidu glu-204 décrit par Watanabe et coll. (1993). Malgré son nom, le précurseur de la chitinase humaine a été placé dans le groupe des PAC, vu l'absence du deuxième résidu crucial. Les chitinases présentées proviennent, respectivement, d'une levure, d'une bactérie, d'un nématode et d'un insecte.

#### 4.1.4- Polymorphisme allélique

Les mucines épithéliales présentant toutes un polymorphisme allélique au niveau des répétitions en tandem, nous avons ensuite vérifié si l'oviductine de hamster présentait aussi cette caractéristique. Une amplification par PCR de la région comprenant les répétitions en tandem a été faite sur trois matrices différentes, à l'aide des amorces 12S et 12A; une première amplification, faite sur différents clones positifs bactériophagiques isolés lors du criblage de la banque d'ADNc avec la sonde OV2S-OV4A (voir plus haut), a indiqué l'existence de trois produits de tailles différentes (fig. 7A). La même amplification, faite sur un pool d'ADNc d'oviductes de hamster provenant de 5 animaux a quant à elle révélé l'existence de deux produits de tailles différentes (fig. 7B). Finalement, l'amplification à partir d'ADN génomique de hamster a également démontré l'existence de deux produits différents (fig. 7C). Un buvardage de Southern à l'aide de la sonde B sur de l'ADN génomique de hamster traité par diverses endonucléases de restriction a révélé que la multiplicité de taille des produits obtenus est due non pas à la présence de plusieurs copies du gène ou de l'existence d'un groupe de gènes apparentés, mais bien à un polymorphisme allélique du gène de l'oviductine de hamster. Le séquençage des trois différents produits obtenus démontre l'existence d'ADNc contenant 5, 6 ou 7 répétitions en tandem, le clone isolé à l'origine comprenant 6 répétitions. La forme comprenant 5 répétitions en tandem, de loin la moins fréquente, contient une délétion de deux bases dans la première de ses répétitions, ce qui se traduit par la présence d'un codon d'arrêt à 17 nt en aval de ladite délétion. De

plus, dans le cas des amplifications résultant en l'obtention de seulement deux produits, le séquençage a révélé que ceux-ci correspondaient aux formes de l'oviductine à 6 et 7 répétitions en tandem. Il est à noter que l'homologue humain de l'oviductine présente aussi un polymorphisme allélique, avec quatre allèles différents (Lapensée et coll., 1997). L'existence de polymorphisme allélique chez la souris n'a pas été vérifié.

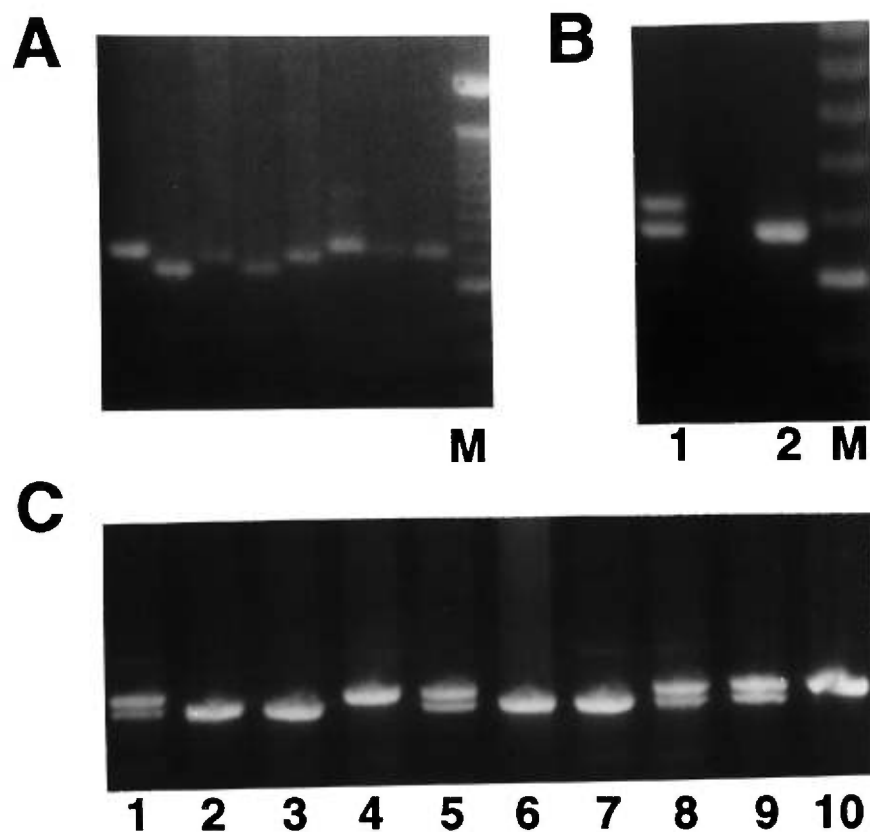


fig. 7: Polymorphisme allélique du gène de l'oviductine de hamster. Amplification par PCR de la région comprenant les répétitions en tandem, à l'aide des amorces 12S et 12A. M, marqueur de poids moléculaire de multiple de 100 pb. **A**: amplification sur 8 bactériophages isolés lors du criblage avec la sonde A. **B**: Amplification sur ADNc d'oviductes provenant de 5 hamsters (puits 1), et du clone d'ADNc dont la séquence peptidique déduite est présentée dans la fig. 4. **C**: Amplification sur ADN génomique de 10 hamsters.

#### 4.1.4.1- Détermination du nombre de copies du gène

Une vérification du nombre de copies du gène a été faite, par analyse de Southern sur de l'ADN génomique traité par diverses endonucléases de restriction ne possédant pas de site de coupure dans la région reconnue par la sonde. La sonde B, reconnaissant la région englobant les répétitions, a été utilisée à cet effet. Les parties aliquotes d'ADN traitées par les endonucléases SstI, RsaI et PstI ne présentent qu'une seule bande à l'autoradiographie, indiquant ainsi la présence d'une seule copie du gène de l'oviductine dans le génome du hamster doré (fig. 8).

#### 4.1.5- Expression tissulaire de l'oviductine de hamster

L'expression tissulaire de l'oviductine a été vérifiée par buvardage de Northern et protection à l'ARNase (Paquette et coll., 1995; Suzuki et coll., 1995). Un buvardage de Northern avec la sonde A sur des ARN totaux d'ovaires, oviductes, utérus et reins de hamster a montré la présence d'un transcrite d'environ 2,4 kb exclusivement dans les oviductes (fig. 9A). Une protection à l'ARNase sur des échantillons d'ARN totaux provenant d'un plus grand éventail d'organes d'une femelle hamster en métrus a corroboré ce résultat (fig. 9B). De plus, il semble que le taux de transcription soit constant tout au long du cycle œstral, comme le suggère la protection à l'ARNase sur des ARN totaux d'oviductes prélevés à différents stades du cycle (fig. 9C).

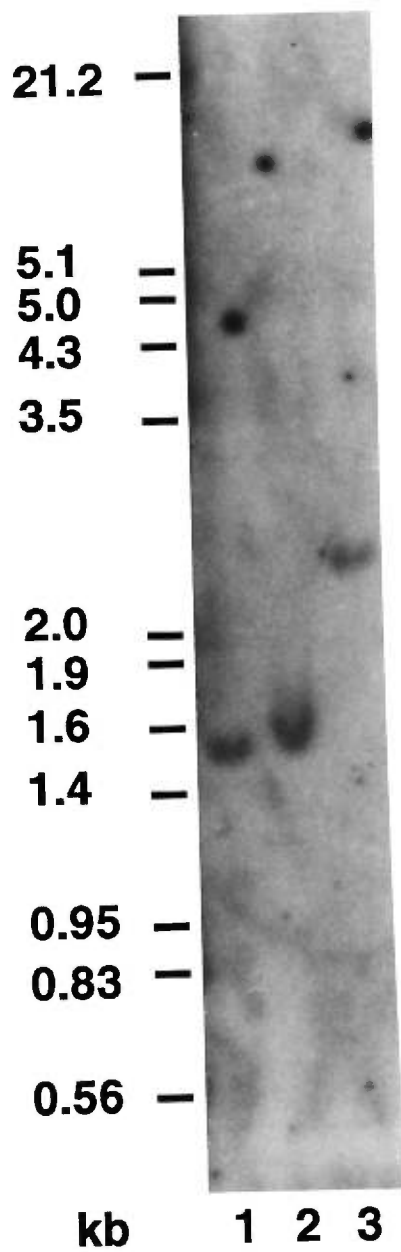


fig. 8: Estimation de la taille du gène de l'oviductine de hamster. Digestion d'ADN génomique de hamster par diverses endonucléases de restriction. Puits: 1, Sst I; 2, Rsa I; 3, PstI. M: marqueur de poids moléculaire (ADN de bactériophage  $\lambda$  digéré par EcoRI et HindIII).

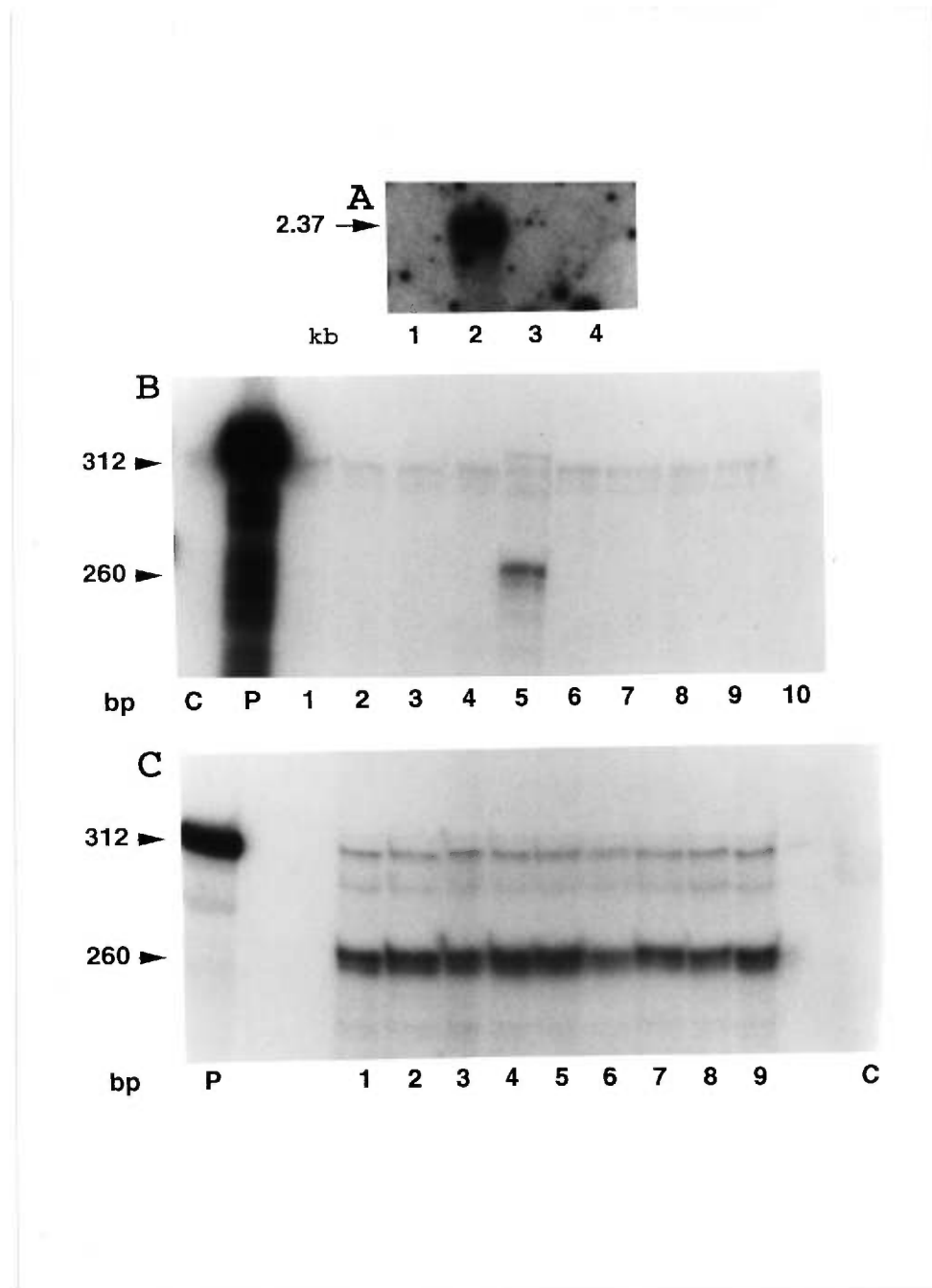


fig. 9: Expression tissulaire de l'oviductine de hamster. **A:** buvardage de Northern à l'aide de la sonde A sur ARN totaux d'ovaire (puits 1), d'oviducte (puits 2), d'utérus (puits 3) et de rein (puits 4). La taille du messager est d'environ 2,4 kb (flèche). **B:** Protection à l'ARNase sur ARN totaux de divers organes prélevés d'une femelle en métoœstrus; puits: C: contrôle négatif; P: sonde non-digérée; 1: ovaire; 2: utérus; 3: rein; 4: rate; 5: oviducte; 6: foie; 7: poumon; 8: glande salivaire; 9: estomac; 10: intestin. La flèche supérieure indique la taille de la sonde complète, et la flèche inférieure celle des fragments protégés par la sonde. **C:** Protection à l'ARNase sur ARN totaux d'oviductes prélevés en 1: dioœstrus tardif II; 2: proœstrus précoce; 3: proœstrus tardif; 4: œstrus précoce; 5: milieu de l'œstrus; 6: métœstrus précoce; 7: métœstrus tardif; 8: dioœstrus précoce I; 9: dioœstrus tardif I; C: contrôle sans ARN; P: sonde non-digérée. Les flèches sont telles qu'en **B**.

## 4.2 Caractérisation du gène encodant l'oviductine de hamster

### 4.2.1- Estimation de la taille du gène de l'oviductine de hamster

Avant d'entreprendre des démarches visant à isoler le gène de l'oviductine, il s'avérait nécessaire d'évaluer la taille du gène. Un buvardage de Southern sur une série de parties aliquotes d'ADN génomique de hamster digérées par diverses endonucléases de restriction a été fait, en utilisant comme sondes les deux clones ayant servi à l'élucidation de la séquence complète de l'ADNc, chacun excisé du vecteur plasmidique dans lequel il avait été cloné. L'analyse de l'autoradiogramme obtenu suggère une taille avoisinant les 12 à 16 kb pour la partie du gène de l'oviductine englobant la séquence codante (fig. 10).

### 4.2.2- Clonage et séquençage de la partie 5' flanquante

L'isolement de la partie 5' non-traduite s'est fait en deux parties. Le premier fragment de cette région du gène de l'oviductine a été isolé selon une technique d'amplification par PCR, décrite par Iwahana et collaborateurs (1994), avec certaines modifications. Notons que cette méthode a été utilisée à la suite de nombreux essais infructueux de criblage d'une banque d'ADN génomique commerciale utilisant des amorces dérivées de la séquence de l'ADNc. Une amplification par PCR utilisant l'amorce 7AL, dérivée de la séquence connue de



l'oviductine de hamster (Paquette et coll., 1995) et l'amorce CP1, s'appariant à la cassette, a permis d'obtenir un produit de 1327 pb. Ce produit, baptisé fragment AvrII, comprend les exons 1 et 2 dans leur totalité ainsi que les introns 1 et 2, une partie de l'exon 3 et 209 pb de la région 5' flanquante. La région 5' flanquante est ici définie comme étant la portion du gène se trouvant en amont du site d'initiation de la transcription, ce dernier étant décrit un peu plus loin. À l'analyse de cette région 5' flanquante, quatre composantes priment sur les autres. Premièrement, la présence d'une boîte TATA qui, quoique correctement située, diverge de la séquence consensus par une base ( $-33\text{TAT}\underline{\text{T}}\text{AA}-28$ ). Deuxièmement, la présence d'un site potentiel de liaison du récepteur aux œstrogènes (ERE), presque parfaitement consensus ( $-107\text{GGTCACTGTGAC}\underline{\text{I}}-95$ ). En troisième lieu, on remarque aussi l'absence d'une boîte CAAT correctement positionnée. Finalement, le seul site de liaison potentiel respectant parfaitement son consensus, un site Sp1 inversé ( $-14\text{CCCGCCCC}-7$ ), situé entre la boîte TATA non-consensus et le site d'initiation de la transcription (tableau II). Il est important de souligner que la séquence de cette région du gène a été obtenue à partir de trois fragments de PCR différents, et que ces trois fragments avaient exactement la même séquence.

Une deuxième approche d'amplification par PCR a été utilisée afin d'obtenir un fragment plus substantiel de la région 5' flanquante. L'amplification a eu lieu sur une banque d'ADN génomique commerciale, avec l'amorce spécifique G2A, dérivée de la séquence connue du produit AvrII, et l'amorce T3L, dérivée de la séquence de

l'un des bras du bactériophage utilisé pour la construction de la banque. Vu la possibilité d'obtenir plusieurs produits différents, un buvardage de Southern a été fait à partir d'une fraction du mélange obtenu suite à l'amplification, à l'aide de la sonde PRO. La comparaison de l'autoradiogramme avec une copie du gel d'agarose a permis d'isoler et cloner un seul produit. Le produit obtenu, appelé B8, a une taille de 2828 pb et comprend un chevauchement de 835 pb avec le produit AvrII, avec un taux d'identité, pour ce chevauchement, de 100%. Cette partie commune comprend le site d'initiation de la transcription (voir plus loin), la boîte TATA non-consensus, le site potentiel de liaison du récepteur aux œstrogènes ainsi que le site inversé Sp1. Le produit B8 comprend 2203 pb de la région 5' flanquante du gène de l'oviductine de hamster, dont 1992 pb se situent en amont du produit AvrII (fig. 11). Entre autres éléments qui ressortent, la présence de séquences TATAAA en positions -432/-427 et -1313/-1308. Soulignons que, pour contrecarrer d'éventuelles erreurs dues à l'utilisation d'une amplification par PCR, la presque totalité de la région 5' flanquante a été obtenue à partir de trois fragments différents, en particulier pour ce qui est de la région 5' flanquante proximale.

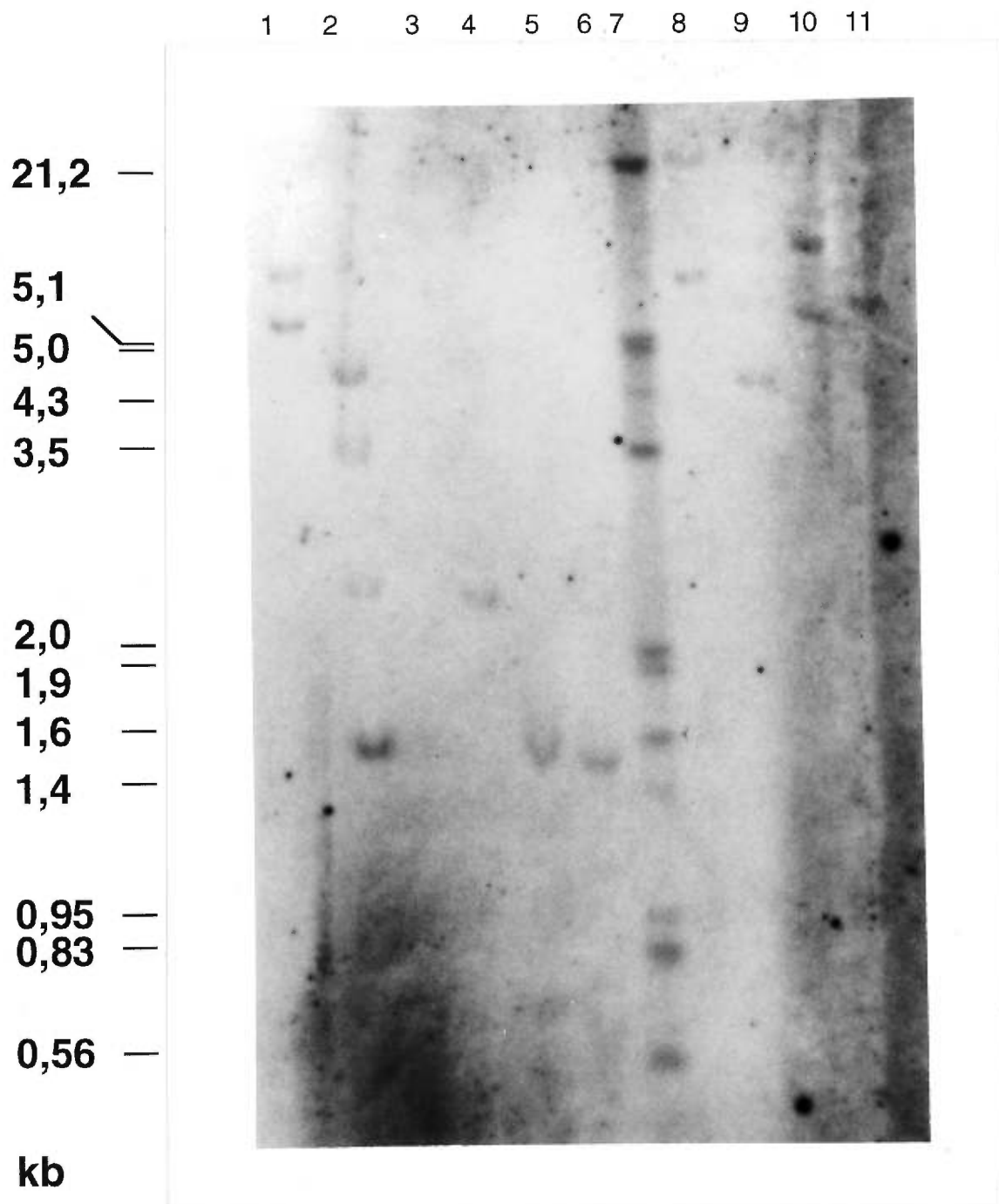


fig. 10: Estimation de la taille du gène de l'oviductine de hamster. De l'ADN génomique de hamster a été digéré par diverses endonucléases de restriction. Puits 1: BamHI; 2: EcoRI; 3: vide; 4: PstI; 5: RsaI; 6: SstI; 7: M; 8: ApaI; 9: BglII; 10: KpnI; 11: NheI. M: marqueur de poids moléculaire.

-2202 GAAATCTTCAGTTATCCAAAGTAAACGTAATCAGTAAATAATCTTTCCCTGTAAAGAAATAGGCTAAAGCATAAAAGAAAAGACCTCGAAAATGCCA  
 -2112 GTGGATGTGTCATPAGAAAGCAGTGGCTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTGTGTATAAAAACAAAGAACTGAAGGAATAAAAAATGTGAACAAAATGGGCACA  
 -2022 GCACACTGATTTTCTATAATTAAATCTTAATTGATCAACCACTAATGTCAGAAATCAGAGTTGCCAGGTTTTTGGCATTTGTCACTCCTTGGGA  
 -1932 TTAGGCAGAGCTCAATTGATGGCAACCATTGTTCTGTCTTCAGCATCCAAAGTACTGTCTGTGGATGTGGAGAGATGAGGTGCA  
 -1842 GATTTGTTAGGTAAAGTTATCTGGCAGCAGTTGATTTGAAGGTTACAAAATGTCAAATCATGCAFAAAAATCTTTGAAAAGCCAGGAGTCAAGA  
 -1752 AGTAGAGGTTCAACATTTCAATAAAGTATTTAAAAGGGAACCAGTTAGAGTTTCAGGCCATGAGAGAGCTTGACAAGACTGAGGCCCCAGAAAAC  
 -1662 CAAACCTTAGTACCAGTAAATTTCCAGATCAACCTTTGCCAAGTCAATAGATTAATCAATAAACAAGAAATTTGGGCACATTTGGCCAGTACTGAGAAAAGC  
 -1572 ATGGTCAATPAGAGTCGAACATCGGGAGTCGTTAATTAATGCTTTGGGAGGCTTGTGATCTTCTGATTTCTGATTTAGGTTAAACAGTAGCCCAAAG  
 -1482 AATGAAAGCATGTAGATAGGACTCAAAGGACCCAGGGATGATGCAGAGCAGGAAGGGGCCCTGGGGTTTTTGTGATAATAAAGCCAAATGA  
 -1392 TTTCTTACTGCAACCATTGTTGCTTTCCAAGAACTATCTCTCTCTCTCTCAATTTGCCTTCAATTTGCCCATTGTTCTTTGATATTAGTATAAAAAATGA  
 -1302 GTTTTCTTTGCTTAGTTCAATCAATAAGTGAAGGTTCAAGATGCTCAACAGATTTGACCCGCTGGGCATAAATTTCTTAAACCCCTTTCTACACA  
 -1212 TGTGCAGCAGCATCTGTCTCAGAGAGAGGGCACACCGTTGAAAACCATTTGGAACAGGAAAAGAGAAAACACATGGATTAAAGCAACAGCT  
 -1132 GATGTACAGACTTTTTTAAAAATCTTTCAATGTTGCAATTTCTTTAAAAATTGACTTTCTGGGTGTTCCATAATCATATTTCTCTGAGGCT  
 -1042 CAGGTGCCAATCTCATGGCTGGCTCATATACTGTTTCCCAAAATGTTTCTAGTTTTCAGGGTTTTTGTGTTGTCATGGTTTTTGTGTTGT  
 -952 TGTATTGTTGTTGCGTGTAGAAAAGTAAATGGCTTATCAACTCCAGGCCCACTCGCCATGCAGGACAACCAATAAAGTCTATTCAAGTGTGA  
 -862 CTATCCCCCTACTTTACCAATCTCTCTGACCCGAAGGGCTTCATGTCAGTTGACAGTGAAGGTTCAAGGGAAGCAGAGGAGGACTAGT  
 -772 GCGATAGTTCTCCAGTCAGACTGCACACTGGACACCCGGTCTGAACCTGTGTTGTGTAGAGAAATGCGGTGTTTCAGGGTGTATTACTCCAC  
 -682 CTGTTGACTTGAGCTGCTTTGGTTGAGTGTCAAGGTTTGTAGCATTTGCTTTTACACTATCTTTTCAGTTCTCTGTTAATTTCTGGGAGATAAGAAATGAGCTATTAGCTCG  
 -592 TTAAGCTCTTGTTTTTTATGCAAGCCGCAATTTCACTATCTCTTTTCCAGTTCTTCTGTTAATTTCTGGGAGATAAGAAATGAGCTATTAGCTCG  
 -502 AGAAAAACAGACTTTTTTGTGTGTGGAACCTTCAGGGGCTCAAATAACTCATCCAAAATATAAAAACGTGTAAGTGGTTGTTAACAAGAGT  
 -412 GCTACCTTTGGCTCTGAAGCCAGAAATCCAAAAGCTGAAGCACCAAAGCTTCATGACACTGTTTTCTGATAAATCTATGGATATACTCCATCA  
 -322 TTCAGTGTTTTCTCCTCCACTCAGCTGTGGGGAGTTGGGTACCAGGAAATGGGGCCAAATGCCCAGACAAGGCTCAGGAAACACTGCCCCTTG  
 -232 TCTTTGTTATAGCCCTAGGGTGAACACTGACTCCCCTGCTAGCGTCCAGCCACGGATGTGGCTTTGTTGGCCCTGAGGACTACAGCTGTTCC  
 -142 TGAGAGGGGAGTAGAAAGTATTTCTGAGGTTCACTGTGACTTGTGTTTCTGGCCATGGCATGTGTGTACTTGGGCTCTCCCCATGCTGCACATGG  
 -52 GCCAGCTCCCTATTTAAAGGGTCTTTGAGCTCCCCGCCCAATGCTGTGCCAGACAGCTGAGATG M

fig. 11: Séquence de la région 5' flanquante du gène de l'oviductine de hamster. La boîte TATA non-consensus, l'ERE presque parfait et plusieurs demis-ERE sont indiqués en rouge. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par un astérisque, alors que le codon de départ, inclus en guise de référence, est en bleu.

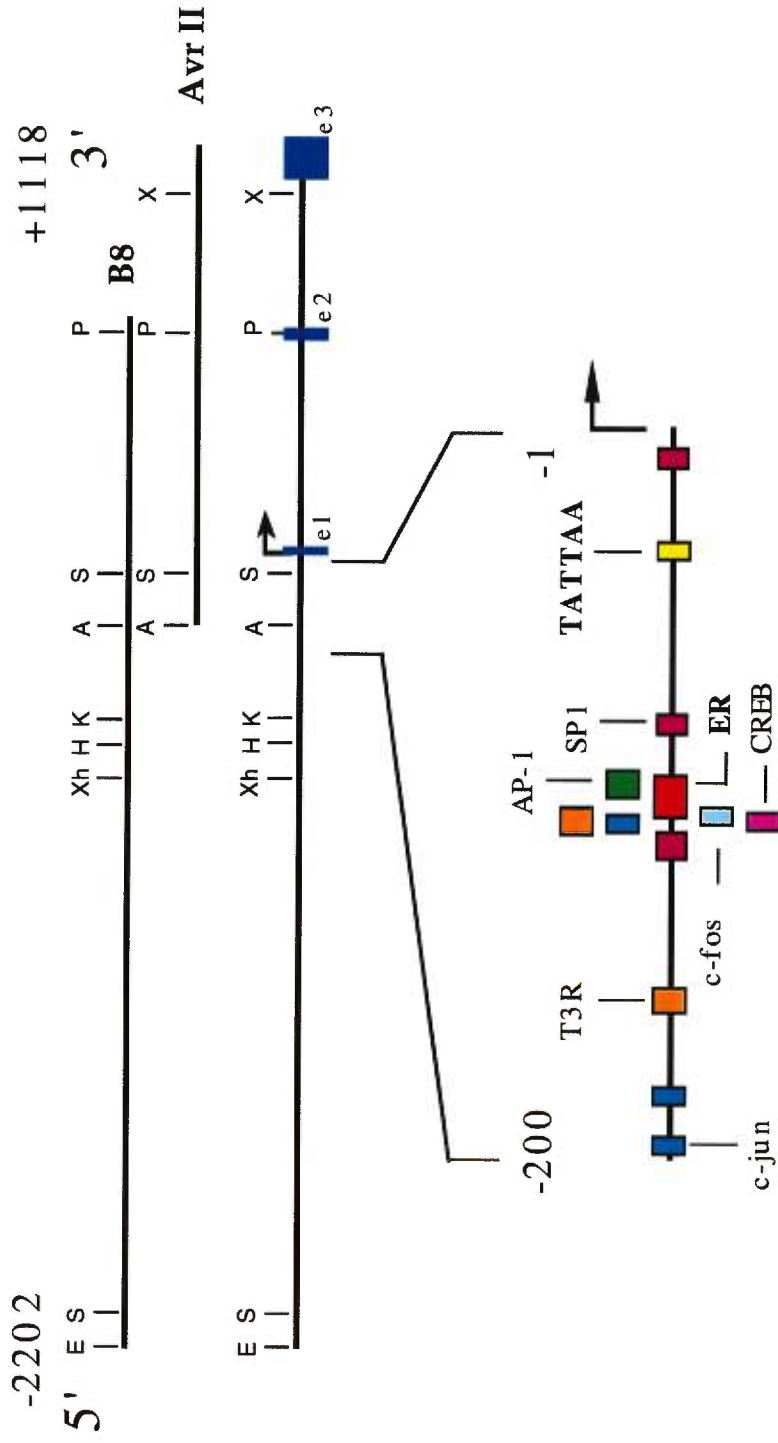


fig. 12: Représentation schématique de la région 5' flanquante du gène de l'oviductine de hamster. Les deux produits de PCR couvrant la région 5' flanquante sont indiqués, ainsi qu'une représentation schématique de la séquence résultante. La portion -1 à -200 est agrandie pour démontrer les sites potentiels de liaison de facteurs de transcription. Quelques sites de restriction choisis sont aussi inclus. A: AvrII, E: EcoRI, H: HindIII, K: KpnI, P: PstI, S: SacI, Xb: XbaI, Xh: XhoI.

#### 4.2.3- Détermination du site d'initiation de la transcription

Une extension de l'amorce a été faite sur des ARN totaux d'oviductes de hamster, à l'aide de l'amorce spécifique G1A0, pouvant s'apparier dans une région correspondant au premier exon de l'oviductine de hamster. Le résultat obtenu corrobore les résultats publiés précédemment (Suzuki et coll., 1995), confirmant ainsi l'existence d'un seul site d'initiation de la transcription situé à seulement 14 nt en amont du site d'initiation de la traduction pour le gène de l'oviductine de hamster (fig. 13).

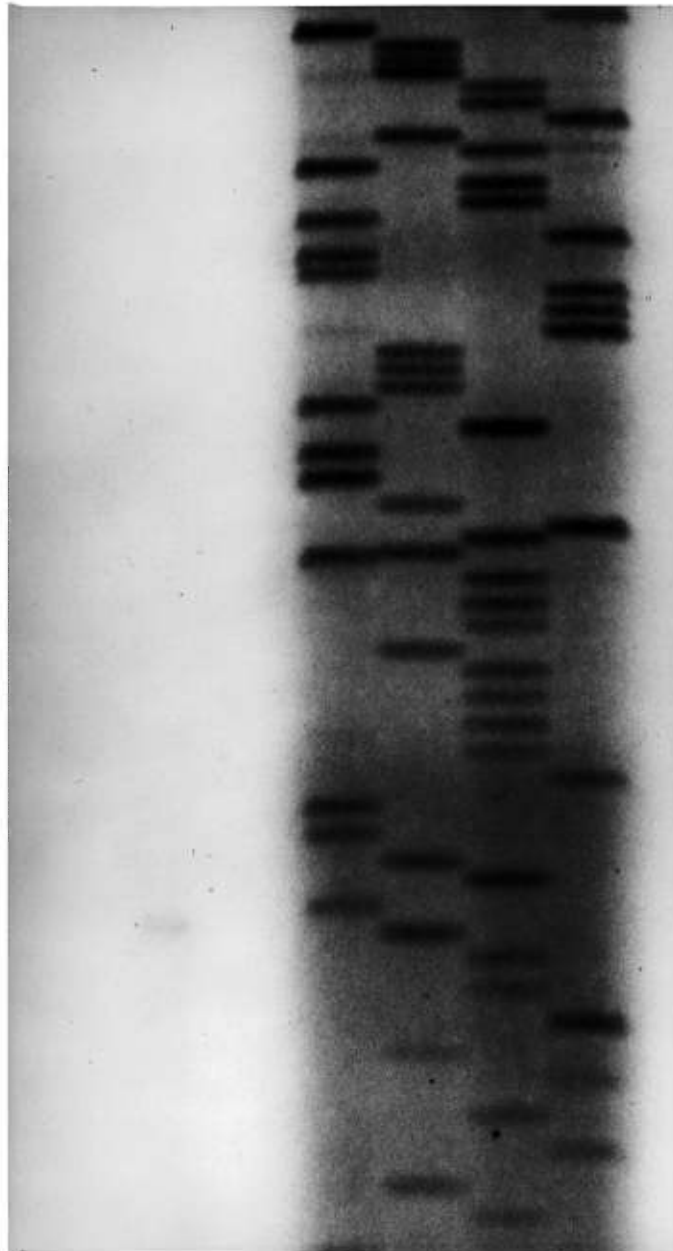


Fig. 13: Détermination du site d'initiation de la transcription du gène de l'oviductine de hamster. Le même oligonucléotide antisens, s'appariant à une région comprise dans le premier exon, a été utilisé pour l'extension de l'amorce et pour le séquençage de référence. Un seul produit a été obtenu. La séquence du brin complémentaire d'ADN est la suivante: 5' ATGGGCCA GCTCCTCT TAAAGGGT CTTGACGT CCGCCCC ATTGCTGC CAGACAGC 3', et le nt souligné correspond au premier nt de l'ARNm.

| Espèce  | ERE           | BOITE<br>TATA | 5' NT<br>(nt) | Références                       |
|---------|---------------|---------------|---------------|----------------------------------|
| hamster | GGTCANNNTGACT | TATTAA        | 14            | Merlen and Bleau<br>,AF026552    |
| humain  | GGTCANNNTGACT | TATAAA        | 12            | Jaffe R. C.,U58001               |
| humain  | GGTCANNNTGACT | TATAAA        | 12            | Lee K. F. et al,<br>AF189710     |
| souris  | GGTCANNNTGACT | TATTAA        | 14            | Lee K. F. et al,<br>AF148876     |
| souris  | GGTCANNNTGACT | TATTAA        | 14, 18        | Takahashi and Araki,<br>AB006193 |

Tableau II: Comparaison d'éléments retrouvés à proximité du site d'initiation de la transcription de l'oviductine de hamster et ses homologues humain (OGP) et murin (Ogp). Les divergences des consensus respectifs sont indiquées en caractères gras. Les régions 5' NT sont définies comme étant la portion de séquence située entre le site d'initiation de la transcription et le site d'initiation de la traduction, et leur taille a été déterminée selon les données obtenues par leurs auteurs respectifs.

#### 4.2.4- Caractérisation de la structure du gène

Dans le but de recueillir le plus d'information possible sur l'oviductine, la disposition des exons et des introns dans le gène de l'oviductine de hamster a été étudiée. La contrepartie génomique de l'ADNc de l'oviductine de hamster a été isolée en plusieurs fragments, par amplification par PCR à l'aide d'amorces spécifiques dérivées de la séquence de l'ADNc, sur de l'ADN génomique de rein de hamster femelle. En plus des produits B8 et AvrII, six autres produits de PCR ont été nécessaires afin de couvrir l'ensemble de la séquence codante, à savoir les produits 4SL-8AL, 8SL-10AL0, 9SL0-10AL, 10SL2-5AL, 5SL0-6AL2 et 6S-13A (fig. 14). Après clonage et séquençage de chacun des produits, il a été déterminé que la partie codante du gène de l'oviductine de hamster est répartie en 11 exons, dont le dernier, à lui seul, représente 50 % de la séquence codante.



Par ailleurs, ce dernier exon comprend la séquence codant pour la région riche en résidus P, T et S, ainsi que celle codant pour l'ensemble des répétitions en tandem. Toutes les jonctions exon/intron respectent la séquence consensus des sites d'épissage, GT/AG, telle que décrite à l'origine par Breathnach et collaborateurs (1978) (tableau III).

| Site d'épissage 5' | Intron(kb)                    | Site d'épissage 3' |
|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| exon 1...GTTG      | <b>GT</b> - 0.540 - <b>AG</b> | GGCT...exon 2      |
| exon 2...GACG      | <b>GT</b> - 0.387 - <b>AG</b> | GTAC...exon 3      |
| exon 3...AGAG      | <b>GT</b> - 0.676 - <b>AG</b> | CCAG...exon 4      |
| exon 4...CACG      | <b>GT</b> - 1.488 - <b>AG</b> | GTTC...exon 5      |
| exon 5...TGAA      | <b>GT</b> - 0.376 - <b>AG</b> | GAGC...exon 6      |
| exon 6...GAAG      | <b>GT</b> - 1.347 - <b>AG</b> | ACGT...exon 7      |
| exon 7...TTCG      | <b>GT</b> - 0.085 - <b>AG</b> | GCAT...exon 8      |
| exon 8...TGAG      | <b>GT</b> - 1.546 - <b>AG</b> | GTTT...exon 9      |
| exon 9...CAAG      | <b>GT</b> - 3.953 - <b>AG</b> | GCAA...exon 10     |
| exon 10...GCAG     | <b>GT</b> - 0.876 - <b>AG</b> | AGTT...exon 11     |

Tableau III: Jonctions exon/intron du gène de l'oviductine de hamster. Les deux nucléotides limitrophes de part et d'autre de l'intron sont présentés en gras afin de souligner le parfait respect de la règle GT/AG. La taille indiquée pour chacun des introns inclue les nt en gras.

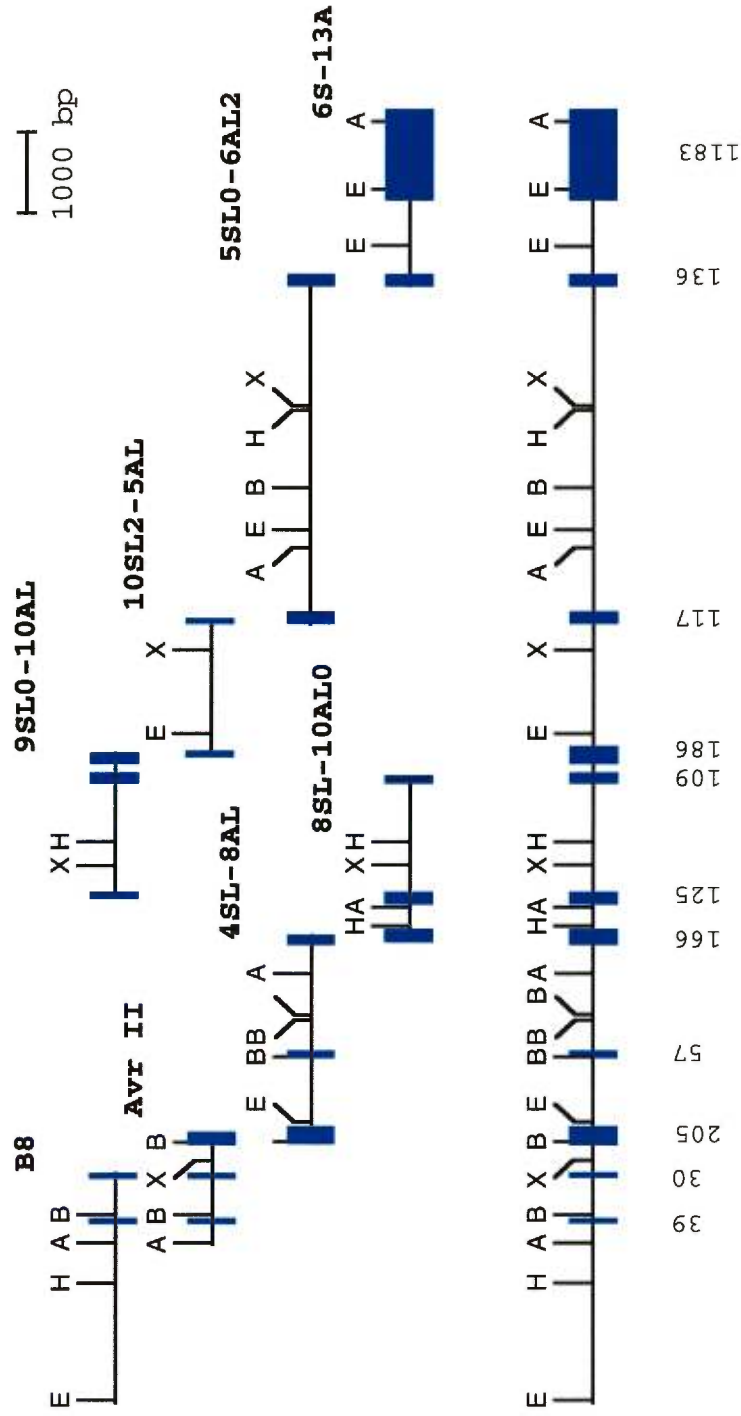


fig. 14: Représentation schématique de la structure du gène de l'oviductine de hamster. Les huit produits de PCR utilisés pour obtenir l'ensemble de la région codante du gène sont présentés, de même qu'une représentation de la séquence résultante. Les exons sont représentés par des rectangles bleus, avec leur taille respective, en nt, juste au-dessous. Des sites de restrictions choisis sont aussi inclus: A: AvrII; B: BamHI; E: EcoRI; H: HindIII; X: XbaI. La séquence résultante porte le no. de référence Genbank AF026552.

#### 4.2.5- Comparaison de la structure du gène de l'oviductine de hamster

Le nombre et la taille des exons du gène de l'oviductine de hamster correspondent presque parfaitement avec ceux de ses homologues humain, hOGP (*human Oviductal GlycoProtein*, RC Jaffe, travaux non publiés; Genbank U58001-U58009) et murin, Ogp (Takahashi et coll., 2000; Genbank AB006193). Le nombre d'exons est en effet le même pour toutes, soit onze, et neuf de ceux-ci ont exactement la même taille, excluant les premier et dernier exons, qui montrent de légères variations (fig. 15). On observe aussi un profil d'organisation assez similaire pour les gènes Ym1, encodant une protéine murine sécrétée par les macrophages activés et CHI3L1 (la YKL-40 humaine) encodant une protéine humaine produite par les macrophages en stade avancé de différenciation (aussi connue sous l'acronyme HC gp-39, pour *Human Cartilage glycoprotein 39 kDa*). Il est à souligner que ces deux protéines avaient aussi été mises en évidence lors de la recherche de similarité au niveau des séquences nucléotidique et peptidique de l'oviductine.

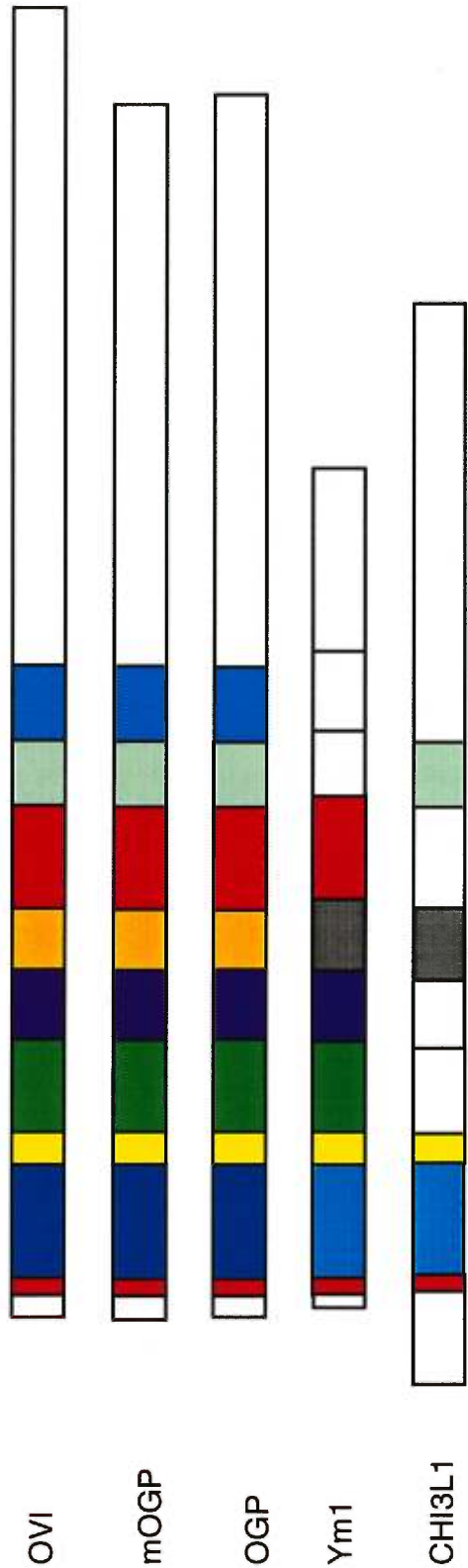


fig. 15: Comparaison du nombre et de la taille des exons de gènes encodant des oviductines et des PACs. Les région codantes des oviductines de hamster (Ovi), de souris (Ogp) et d'humain (Ogp), de la PAC murine Ym1 et de la PAC humaine CHI3L1. Les exons de même taille en positions équivalentes sont de même couleur.

## 5. Discussion

### 5.1- Analyse des séquences nucléotidique et peptidique de l'oviductine de hamster

L'obtention, le clonage et le séquençage de l'ADNc de l'oviductine de hamster a permis de déterminer sa séquence peptidique. Bien que des études précédentes aient permis de caractériser l'oviductine au niveau biochimique chez plusieurs espèces, l'analyse moléculaire de l'oviductine a permis de confirmer certains points déjà unanimement acceptés, ainsi que de faire de surprenants rapprochements avec des familles de protéines qui, à première vue, ne semblent présenter aucun lien de parenté.

#### 5.1.1- Séquence nucléotidique

Le séquençage de l'ADNc a confirmé que le clone obtenu lors de l'amplification par PCR imbriquée, à l'aide des amorces OV1S, OV2S, OV4A et OV6A, sur une banque d'ADNc d'oviducte de hamster correspondait bien à l'oviductine, par comparaison avec la séquence amino-terminale préalablement obtenue par dégradation d'Edman (Malette et Bleau, 1993). La stratégie visant à utiliser des amorces antisens basées sur une région de haute similitude de séquence des ADNc d'oviductine de bovin (Sendai et coll., 1994) et de babouin (séquence partielle, Donnelly et coll., 1991) témoigne de la confiance placée dans les travaux effectués par de nombreuses équipes

différentes, qui tendent à démontrer que l'oviductine est une entité bien conservée chez les mammifères.

Le produit OV2S-OV4A, comprenant *grosso modo* la moitié amino-terminale de l'oviductine de hamster, ne semble offrir *a priori* que peu d'éléments pouvant permettre d'avancer des hypothèses quant au rôle biologique possible de cette glycoprotéine. Par contre, l'insert du bactériophage 19, englobant à peu près les deux derniers tiers de la séquence complète de l'ADNc, offre immédiatement des informations quant à la nature de l'oviductine. La présence de six répétitions en tandem presque identiques de 45 pb, entre les nt 1441 et 1711, est la première caractéristique qui m'est apparue à la lecture du gel de séquence. De plus, le nombre même de nt dans chacune des répétitions (multiple de trois) et le fait que celles-ci soient en phase avec le cadre de lecture le plus long permettent de supposer une transposition de ces répétitions au niveau peptidique. Autrement, la lecture des 2276 nt d'ADNc ne permet que de conclure que cet ADNc a un cadre de lecture ouvert de 1905 nt, une région 3' NT de 371 nt, et un signal de polyadénylation situé entre les nt 2258 et 2263, inclusivement.

#### 5.1.2- Séquence peptidique déduite

La séquence peptidique déduite du cadre de lecture ouvert de 1905 nt révèle un peptide de 635 a.a., dont 17 des 18 premiers a.a. sont identiques à ceux obtenus par séquençage de la partie amino-terminale de la protéine mature sécrétée (la dégradation d'Edman

identifiait le douzième a.a. comme étant une isoleucine, alors que la séquence déduite indique plutôt une histidine). Les amorces sens utilisées lors de l'obtention de l'ADNc étant dérivées de la séquence amino-terminale de la protéine mature sécrétée, la séquence déduite ne comprend pas le peptide signal, et débute ainsi par une tyrosine plutôt que par la méthionine habituelle. Le peptide déduit a une masse moléculaire de 69 358 Da. Une analyse minutieuse de cette séquence déduite révèle qu'il y a bel et bien six répétitions en tandem de 15 a.a. presque identiques -comme le suggérait la séquence nucléotidique- retrouvées entre les positions 480 et 570. De plus, cinq de ces six répétitions présentent également un site consensus de N-glycosylation; deux autres de ces sites sont retrouvés en amont des répétitions, portant le total à 7. Ces observations confirment au niveau moléculaire ce que plusieurs travaux précédents (Robitaille et coll., 1988; Kan et coll., 1990; Abe et Oikawa, 1991; Abe et coll., 1992; Malette et Bleau, 1993) avaient démontré au niveau biochimique: l'oviductine de hamster peut porter des groupements glycosylés. Les répétitions présentent une autre caractéristique digne de mention: elles sont riches en résidus P, T et S. Des 90 a.a. composant ces répétitions, 34 sont des résidus P, T ou S. Cette particularité prend toute son importance lorsque l'on compare la masse moléculaire du peptide déduit (69,4 kDa) à celle de la protéine mature sécrétée (160-210 kDa). Des travaux sur l'oviductine de hamster utilisant la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation (Malette et Bleau, 1993), ou la N-glycanase (Sendai et coll., 1994), indiquent que les groupements N-glycosylés ne représentent qu'environ 10 et 8 kDa chez le hamster et la vache, respectivement. Le corollaire qui découle

de ces résultats est que la vaste majorité des groupements glycosylés sont de nature O-liés. Or, avec ce nouvel élément, l'oviductine se classe maintenant parmi la famille des mucines, dont les principaux attributs sont des répétitions en tandem d'a.a. riches en résidus P, T et S, ainsi qu'une forte proportion de groupements O-glycosylés (Strous et Dekker, 1992; Gum, 1995; Van Klinken et coll., 1995; Porchet et coll., 1999).

## **5.2- Recherche de protéines similaires dans les banques de données**

### **5.2.1- Les oviductines homologues**

À la rédaction de cette thèse, les séquences plus ou moins complète d'ADNc d'oviductines de huit espèces avaient été répertoriées dans les banques de données, soit les oviductines du hamster doré (U15048; D32218), murine (D32137), humaine (U09950; U58010; I38605), de singe rhésus (U87259), bovine (D16639), porcine (U43490), ovine (U16179; U17988), de babouin vert (M59903; A37954 séquence partielle), ainsi que la séquence partielle d'une neuvième espèce, soit l'oviductine du macaque bonnet chinois (384 nt; AF132215). Le taux d'identité entre les diverses séquences avoisine les 70% en moyenne (tableau I).



Malgré que la présence de répétitions en tandem soit assez enthousiasmante à première vue, force est de constater que l'absence de pareilles caractéristiques chez la plupart des homologues de l'oviductine de hamster est assez décevante. À ce jour, seules les oviductines murine et humaine contiennent aussi des répétitions, et le nombre, la taille et la séquence de ces dernières ne correspondent pas à celles retrouvées chez le hamster. Quatre allèles de l'oviductine humaine existent (Lapensée et coll., 1997), alors que des études similaires chez la souris n'ont pas été faites. De plus, soulignons que chez l'humain, les quatrième et cinquième répétitions en tandem sont séparées par une répétition incomplète (Lapensée et coll., 1997). Néanmoins, l'ensemble des oviductines semblent être composées, dans leur partie carboxy-terminal, d'une plus forte proportion de résidus P,T et S. Il est donc à envisager que c'est la nature et la proportion de ces résidus qui soient importantes, et non pas la présence ou non de répétitions, pour que l'oviductine puisse remplir son rôle biologique.

### 5.2.2- Les chitinases

La partie amino-terminale de l'oviductine de hamster, bien qu'apparemment moins riche en surprise que son équivalent carboxy-terminale, présente néanmoins une similitude de séquence surprenante avec un certain nombre de chitinases, en particulier pour le site actif de ces enzymes. Les membres de cette vaste famille de protéines possèdent une activité de glycosyl hydrolases permettant la dégradation de la chitine. La similitude est étonnante puisque l'on a

longtemps cru que l'on ne retrouvait la chitine que chez les invertébrés et certaines bactéries (Varki, 1996). Toutefois, il a été rapporté que l'homologue murin du produit du gène DG42, un gène exprimé pendant un court laps de temps dans le développement embryonnaire de la grenouille Xénope (*Xenopus laevis*), peut synthétiser, *in vitro*, de courts oligomères de chitine (Semino et coll., 1996), et donc que la chitine pourrait jouer un certain rôle chez les vertébrés. Les auteurs suggèrent que ces oligomères pourraient jouer le rôle d'amorces durant la synthèse de hyaluran. De surcroît, plusieurs chitinases ont été caractérisées chez les plantes (Collinge et coll., 1993) et les vertébrés (Renkema et coll., 1995; Boot et coll., 1995; Saito et coll., 1999).

Précisons toutefois que l'oviductine de hamster ne possède probablement pas d'activité chitinolytique, puisque, comme initialement observé pour l'oviductine humaine (Arias et coll., 1994), il lui manque un résidu indispensable à l'activité chitinolytique, soit un résidu d'acide glutamique (glu) en position équivalente au résidu glu-204 des chitinases. (Watanabe et coll., 1993). Chez toutes les oviductines c'est plutôt un résidu leucine que l'on y retrouve (fig. 6). Il a de plus été démontré que les oviductines d'ovin (DeSouza and Murray, 1995b), de babouin (Jaffe et coll., 1996) et de porc (Buhi et coll., 1996) ne peuvent pas hydrolyser certains des composés aisément hydrolysés par les chitinases. Toutefois, il est permis d'avancer l'hypothèse que les oviductines puissent avoir conservé la capacité de lier des groupements glycosylés, en particulier la *N*-acétylglucosamine. De plus, il est bon de rappeler que l'oviductine de

hamster s'associe de façon spécifique à la ZP (Fox et Shivers, 1975b; Léveillé et coll., 1987; Kan et Roux, 1995), qui est elle-même composée de trois glycoprotéines.

### 5.2.3- Les protéines apparentées aux chitinases

Les oviductines ne sont pas les seules protéines à présenter une similitude de séquence avec les chitinases, tout en ne possédant pas d'activité chitinolytique. Un nombre croissant de ces protéines, incluant les diverses oviductines, est aujourd'hui connu, et, à défaut d'une appellation plus juste, sont étiquetées "protéines apparentées aux chitinases" (PAC) (Bleau et coll., 1999). Il est à remarquer que plusieurs de ces PAC sont produites par des tissus qui subissent d'importantes modifications structurales. Ainsi, il a été suggéré que YKL-40 puisse être impliqué dans l'involution du tissu mammaire après l'arrêt de la lactation chez le bovin (Rejman et Hurley, 1988), le remodelage du cartilage (Hakala et coll., 1993) et la différenciation tardive du macrophage chez l'humain (Rehli et coll., 1997), ainsi que la réorganisation morphologique des cellules du muscle lisse vasculaire chez le porc (Shackelton et coll., 1995). Les oviductines, quant à elles, sont produites à un moment du cycle où l'ovocyte, fraîchement ovulé, est le plus susceptible d'être fécondé (Roux et Kan, 1995). Les succès de la fécondation *in vitro*, faite en absence de quelconques facteurs tubaires, indiquent que l'oviductine n'est pas indispensable à la fécondation et au développement embryonnaire. Des travaux chez le bovin indiquent que l'oviductine n'a pas d'effet favorable sur le développement embryonnaire *in vitro* (Vansteenbrugge et coll., 1997).

Il n'en reste pas moins qu'elle a la capacité de se lier de façon spécifique à la ZP de l'ovocyte/embryon tubaire. De plus, certaines études observent la présence d'oviductine dans le cytoplasme des blastomères (Boice et coll., 1990a) et suggèrent son internalisation après la fécondation (Kan et Roux, 1993), alors que d'autres rapportent l'observation d'oviductine à la surface des blastomères (Gandolfi et coll., 1991; Murray et Messinger, 1994). La possibilité que l'oviductine joue un rôle dans un tissu en évolution existe donc, ce qui serait un point commun avec certaines des PAC.

Par ailleurs, chez l'humain, il a été démontré que YKL-40 (aussi appelée HC gp-39 et CHI3L1) peut bel et bien lier la chitine (Renkema et coll., 1998), alors que YKL-40 porcine a un site de liaison de l'héparine fonctionnel (Shackelton et coll., 1995). Bien que la similitude avec les chitinases ait permis de suspecter cette caractéristique, cette observation étaye l'hypothèse selon laquelle l'oviductine s'associerait à la ZP par l'entremise d'un "récepteur" composé de groupements glycosylés. La ZP est en effet composée de trois glycoprotéines inter-reliées, et il est bien connu que certains groupements glycosylés de celles-ci sont impliqués dans l'interaction ovocyte/spermatozoïde (voir Tulsiani et coll., 1997, pour une revue à ce sujet). Il est donc permis de croire que l'interaction oviductine-ZP se fasse par l'entremise de groupements glycosylés spécifiques, que ces derniers soient portés par l'oviductine elle-même ou les glycoprotéines de la ZP, ou encore par les deux protagonistes.

Parmi les 23 séquences comparées dans différentes sections de ce travail (9 oviductines, 8 PAC n'étant pas des oviductines, et 6 chitinases), très peu de résidus sont conservés de façon parfaite. De fait, trois seulement le sont, soit les résidus 163-FDG-165 (numérotation selon la séquence peptidique complète de l'oviductine de hamster incluant le peptide signal). Incidemment, ces trois résidus se retrouvent en plein cœur de la région correspondant au site actif des chitinases (voir le consensus global de la fig. 6), indiquant ainsi le rôle potentiellement important de cette région dans le rôle biologique de ces diverses protéines. Le rôle biologique des oviductines et des PAC n'étant toutefois pas connu, on ne peut toutefois éliminer la possibilité que ce "domaine" ne soit pas relié à leurs fonctions respectives. Autre point à souligner, la présence de résidus cystéines (C<sub>a.a.</sub>) très bien conservés. Les oviductines et les PAC possèdent toutes quatre de ces résidus à des endroits identiques ou très similaires de leur structure primaire, alors que la variation est plus grande chez les chitinases étudiées. Néanmoins, un alignement de toutes ces séquences révèle que la C<sub>a.a.</sub> en position 26 (toujours selon la numérotation de l'oviductine de hamster) est conservée dans 21 des 23 séquences, idem pour celles en positions 51 et 303; celle en position 367 est conservée dans 20 des séquences. Notons toutefois la nécessité d'introduire des bris mineurs dans la continuité de certaines séquences pour obtenir un alignement optimal. Il est à noter que la famille 18 des glycosyl hydrolases, lesquelles présentent le plus haut taux de similitude avec les oviductines, ont une structure tertiaire de type baril ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> (Bleau et coll., 1999).

### **5.3- Polymorphisme allélique du gène de l'oviductine de hamster**

Un polymorphisme allélique est observé chez toutes les mucines épithéliales humaines de la famille MUC, et se traduit par l'existence, dans une population donnée, d'allèles possédant des tailles différentes. La différence de taille s'explique par un nombre variable de répétitions en tandem (NVRT), qui s'explique à son tour par une instabilité du nombre de répétitions au travers des générations (Porchet et coll., 1999). Une amplification par PCR de la région incluant les répétitions, sur de l'ADN génomique et des clones positifs isolés lors du criblage de la banque d'ADNc a révélé l'existence de trois allèles différents, c'est-à-dire avec 5, 6 et 7 répétitions en tandem (Paquette et coll., 1995). Il est à noter que le plus petit allèle contient une délétion de 2 nt dans la première répétition, qui se traduit par la présence d'un codon d'arrêt 17 nt plus loin.

Bien que trois allèles aient été observés, des travaux subséquents sur les précurseurs peptidiques de l'oviductine (Malette et coll., 1995b) semblent indiquer qu'il n'y en a en fait que deux. Ce polymorphisme allélique pour l'oviductine de hamster rapproche encore plus celle-ci de la famille des mucines. Des variantes à 6 et 7 répétitions ont été identifiées chez le hamster, quoique l'équipe de Suzuki et coll. (1995) affirme qu'il n'existe que la forme à 7 répétitions chez le hamster. Il se peut fort bien qu'il existe d'autres allèles dans la population de hamster, mais comme la plupart des hamsters dorés utilisés en laboratoire de nos jours proviendraient de la même portée,

capturée au début du siècle (Murphy, 1985), il est fort possible que l'on ne puisse pas détecter d'autres allèles dans cette population. Le hamster doré vivant à l'état sauvage en Syrie, on peut facilement avancer que la capture de nouveaux spécimens serait une entreprise futile.

L'amplification par PCR de la région génomique comprenant les répétitions en tandem a aussi permis de révéler que cette partie codante du gène n'est pas interrompue par un ou plusieurs introns. Or, cette particularité est typique des mucines épithéliales, à la différence que chez celles-ci l'exon comprenant les répétitions est approximativement central dans le gène, alors que chez l'oviductine de hamster et son homologue humain cet exon est le dernier.

L'étude du nombre de copies du gène de l'oviductine a établi qu'il n'y a qu'une seule copie de ce gène dans le génome du hamster. Toutefois, il est fort possible qu'il existe des gènes codant pour des protéines de fonction similaire. Dans le cas des mucines, par exemple, les divers membres de cette famille ne montrent aucune similitude de séquence entre eux; ce sont plutôt des caractéristiques que partagent les mucines, telle une forte proportion de résidus P,T et S. Pourtant, il existe des régions du génome humain regroupant certains des gènes codant pour des mucines. Ainsi, les gènes *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6* sont tous localisés dans la région p15.5 du chromosome 11 (Porchet et coll., 1999), suggérant l'apparition de ces gènes suite à une série de duplication d'un gène ancestral commun. À ce sujet, il est intéressant de remarquer que le gène de l'oviductine humaine (*MUC9*)

est localisé en 1p13 (Lapensée et coll., 1997), tout comme les gènes encodant la PAC YKL-39 (HUMCHIT,1p13.3; no. de référence Genbank U58515) et une chitinase spécifique au poumon (TSA1902L, entre 1p13.1 et 1p21.3 (Saito et coll., 1999); no. de référence Genbank AB025008). Le gène encodant la PAC YKL-40 humaine (HC gp-39) a aussi été localisé sur le chromosome 1. Il est donc permis de croire que ces gènes, tout comme les gènes *MUC* en 11p15.5, ont une origine commune. Comme les produits de ces gènes ne possèdent pas de caractéristiques de mucines (sauf *MUC9*), on peut supposer que ce ne sont pas les attributs de type mucine qui sont les plus importants dans le rôle biologique de l'oviductine humaine - et par extension des oviductines en général -, puisque c'est surtout la partie ressemblant aux chitinases qui est conservée.

#### **5.4- Analyse de l'expression de l'ARNm de l'oviductine**

La détection du messager de l'oviductine exclusivement dans l'oviducte (fig. 9A et 9B) n'a causé aucune surprise, vu que des études similaires précédentes chez le babouin (Donnelly et coll., 1991), le bovin (Sendai et coll., 1994), et l'humain (Arias et coll., 1994) avaient indiqué une stricte spécificité tissulaire. Ces études confirmaient d'ailleurs nombre d'études précédentes d'immunofluorescence indirecte faites à l'aide de divers anticorps, monoclonaux ou polyclonaux, reconnaissant l'oviductine. Toutefois, la glycosylation importante des diverses oviductines fait en sorte qu'il est difficile de produire des anticorps dirigés contre le squelette peptidique de l'oviductine. La plupart des anticorps utilisés reconnaissant un épitope



glycosylé, la possibilité d'obtenir de faux positifs (i.e. une réaction positive dans un tissu exprimant une protéine hétérologue porteuse de groupements glycosylés identiques) ou de faux négatifs (absence de réaction positive dans un tissu exprimant une oviductine différemment glycosylée) ne pouvait être écartée. En l'absence d'un anticorps monoclonal reconnaissant le squelette peptidique de l'oviductine, la détection du messenger s'avère donc nettement plus fiable que l'utilisation d'un anticorps reconnaissant un épitope formé de groupements glycosylés.

La détection, chez le hamster, d'un messenger tout au long du cycle confirme des études précédentes qui démontraient une présence continue de la protéine, avec toutefois un maximum à la période périovulatoire. De plus, l'intensité relativement constante du messenger durant tout le cycle (fig. 9C) suggère que le contrôle de l'expression puisse se faire à un niveau post-transcriptionnel, par exemple en modifiant la demi-vie du messenger. À cet effet, la présence d'un ERE presque parfait -et qui semble fonctionnel selon les travaux de Takahashi et collaborateurs chez la souris (2000)- est intrigante, vu l'absence de, ou la faible, variation de l'expression du messenger de l'oviductine selon le cycle œstral du hamster. Il est possible que l'ERE soit impliqué, chez le hamster, dans l'induction initiale de la transcription du gène de l'oviductine, c'est-à-dire celle coïncidant avec la puberté de la femelle, période où le niveau d'œstrogènes circulant augmente fortement. Ainsi, l'ERE pourrait jouer un rôle dans la synchronisation de la synthèse d'oviductine avec la capacité de la femelle à concevoir et mettre bas. Par contre, chez les espèces où la

variation du messenger est importante, tel que chez l'humain, il n'est pas exclu que l'ERE soit impliqué dans la synchronisation de la transcription de l'oviductine avec une période du cycle -à savoir l'ovulation-, plutôt qu'avec une période de la vie -i.e. la maturité sexuelle- chez le hamster.

Gandolfi et coll. (1991) observent, par immunofluorescence, une périodicité de la concentration de l'oviductine ovine au niveau du fluide tubaire, mais détectent un signal d'intensité à peu près constante dans les granules de sécrétion des cellules sécrétrices; ces auteurs suggèrent donc que le contrôle pourrait se situer au niveau de la sécrétion, du moins chez l'ovine. Finalement, mentionnons qu'il a été rapporté que l'ARNm de l'oviductine, chez l'ovine, a été localisé dans la partie apicale des cellules sécrétrices de l'ampoule et de l'isthme de l'oviducte, soit dans une région où se retrouvent aussi les granules de sécrétion (Murray et DeSouza, 1995). Ces auteurs suggèrent que la localisation du messenger près des granules indique peut-être une façon particulière de contrôler la production de l'oviductine.

Suzuki et coll. (1995) ont suggéré que l'oviductine n'existait que sous une seule variante, soit celle possédant 7 répétitions en tandem. L'équipe de Suzuki prétexte n'avoir observé qu'un seul messenger par buvardage de Northern sur des ARN totaux d'oviductes de hamster, mais l'utilisation d'un gel d'agarose de 1,2% peut difficilement offrir une résolution suffisante pour discerner deux messagers ne différant que par 45 nt, surtout lorsque l'intensité du signal est forte. Peu après

l'observation d'allèles multiples pour l'oviductine, Malette et coll. (1995) rapportaient l'existence de deux précurseurs de 69 et 71 kDa pour l'oviductine. Comme le séquençage des différents allèles a révélé qu'ils ne différaient que par le nombre de répétitions en tandem, et que ces répétitions sont encodées par le même exon, il ne pouvait pas s'agir d'épissage alternatif. De plus, chacune des répétitions complètes possède une masse relative d'environ 1,8 kDa, ce qui correspond très bien à l'écart observé pour les deux précurseurs. Cependant, on ne peut expliquer la grande hétérogénéité de masse de la protéine mature que par l'existence de deux squelettes peptidiques différents. Il est beaucoup plus probable qu'il existe, pour un précurseur donné, plusieurs variantes de glycosylation. La corrélation possible entre l'existence de deux précurseurs et l'observation, en SDS-PAGE, de deux formes majeures de la protéine mature (Malette et Bleau, 1993) n'a pas été étudiée.

### **5.5- Analyse de la région 5' flanquante**

Bien que l'utilisation d'amplification par PCR d'importantes régions d'ADN génomique comporte toujours une certaine part de risques, notamment au niveau de la fiabilité des séquences ainsi obtenues, elle s'avère également une alternative rapide et efficace aux méthodes plus conventionnelles, tel que le criblage de banque d'ADN génomique. Dans notre cas, le respect de plusieurs règles a permis d'obtenir des résultats dignes de confiance. Ainsi, la méthode décrite par Iwahana et coll. (1994, fig. 2) utilise une combinaison d'amorce dont l'une est spécifique à la séquence d'intérêt, et l'autre est

spécifique au système de cassette de séquence connue. Toutefois, lors de la première ronde d'amplification, seule l'amorce spécifique peut s'apparier, assurant ainsi une spécificité accrue de la réaction. De plus, l'utilisation d'oligonucléotides possédant des températures de fusion élevées permet de faire des amplifications dans des conditions plus sélectives, et donc de minimiser les appariements non-spécifiques. Le mélange d'ADN polymérases utilisé contient la polymérase Pwo1, qui possède une activité de correction de synthèse 3'->5', réduisant les probabilités d'erreur de synthèse de plusieurs ordres de grandeur. Afin de confirmer que les produits de PCR correspondaient bien au gène de l'oviductine de hamster, j'ai utilisé une stratégie visant à obtenir, en premier lieu, un fragment recouvrant une bonne partie de la séquence connue de l'ADNc et une partie de la région 5' flanquante, et, en deuxième lieu, un deuxième produit dont la partie 3' comprendrait un important recoupement du premier produit (fig. 12). L'ensemble de ces mesures me permet de croire que la séquence ainsi obtenue est aussi fiable que celle que l'on pourrait obtenir par des méthodes excluant l'amplification par PCR.

L'obtention d'une première portion de la région 5' flanquante, le fragment AvrII, a permis de détecter un certain nombre de points d'intérêt. Tout d'abord, ce fragment a révélé une région 5' NT très courte de 14 nt, ce qui correspond aux valeurs rapportées chez l'humain (12 nt; Arias et coll., 1994; Jaffe et coll., Genbank U58001; Lee et coll., Genbank AF189710), l'ovin (16 nt; DeSouza et Murray, 1995), le hamster (14 nt; Sendai et coll., 1995), le singe rhésus (14 nt; Verhage et coll., 1996), le porc (10 nt; Buhi et coll., 1996), le babouin

(12 nt; Jaffe et coll., 1996), et la souris (14 nt; Sendai et coll., 1995; Lee et coll., Genbank AF148876; 14 et 18 nt, Takahashi et coll., 2000). Puis, une boîte TATA non consensus (TATTAA plutôt que TATAAA), entre les positions -33 et -28 a été identifiée. Enfin, la présence d'un ERE,  $-^{107}\text{GGTCACTGTGACI}_-^{95}$  a aussi été révélée. Bien que cet ERE ne respecte pas parfaitement le consensus, il faut dire qu'il existe une certaine variabilité au niveau de la séquence pouvant permettre la liaison d'un complexe ER/E<sub>2</sub>, et que le consensus a été établi d'après la séquence retrouvée dans la région 5' flanquante du gène de la vitellogénine A2 de Xénope (Klein-Hitpass et coll., 1986). Une étude rapide de cette portion du gène de l'oviductine de hamster démontre aussi l'absence d'une boîte CAAT correctement positionnée, c'est-à-dire aux environ de -70. L'absence d'un élément de contrôle de la transcription aussi important peut paraître intrigante, vu que le gène de l'oviductine est sous une stricte spécificité tissulaire d'expression, mais a aussi été rapportée pour le gène de l'oviductine de souris (aussi appelée *Ogp*, pour *oviductal glycoprotein*; Takahashi et coll., 2000). Selon toutes vraisemblances, l'absence d'une boîte CAAT et d'une boîte TATA consensus chez le hamster et la souris n'empêche en rien la spécificité tissulaire. L'absence d'une boîte TATA consensus nous a poussé à rechercher d'autres éléments pouvant servir au bon positionnement du complexe de l'ARN polymérase II. Les éléments d'initiation ("*initiator elements*") potentiels les plus près du site d'initiation de la transcription se situent à plus de 1 kb du site d'initiation de la transcription, dans le troisième exon; aucun élément correspondant à celui décrit par Lagrange ("*new core promoter element*", 1998) n'a été trouvé non plus. Il est intéressant de souligner

que le gène de l'oviductine humaine, lui, possède une boîte TATA consensus. Incidemment, c'est chez l'humain que l'on observe le contrôle temporel le plus stricte de l'expression de l'oviductine, ce qui se traduit par une grande variation quantitative du messenger et de la concentration d'oviductine dans le fluide tubaire au cours du cycle menstruel (O'Day-Bowman et coll., 1995). Chez le hamster, par contre, le messenger semble transcrit de façon constante tout au long du cycle (fig. 9C). De plus, des études d'immunolocalisation en microscopie photonique et électronique chez l'ovine démontrent que l'oviductine est présente durant tout le cycle dans les granules de sécrétion des cellules sécrétrices, malgré une importante fluctuation du taux d'oviductine dans le fluide tubaire, et suggèrent que le contrôle s'effectue peut-être au niveau de la sécrétion de l'oviductine, plutôt qu'au niveau de la transcription du gène (Gandolfi et coll., 1991).

La présence d'un ERE supporte l'hypothèse selon laquelle les œstrogènes contrôlent l'expression de l'oviductine. Il est connu depuis très longtemps que la hausse du niveau circulant d'E<sub>2</sub> précédant l'ovulation s'accompagne, au niveau du fluide tubaire, de la synthèse de protéines autrement absentes, et ce chez plusieurs espèces (Bishop, 1956; Mastroianni et coll., 1970; Noske et Daniel, 1974; Hanscom et Oliphant, 1976; Oliphant et coll., 1984b; Verhage et Fazleabas, 1988). Dans le cas de l'oviductine, une corrélation positive a été observée entre sa présence dans le fluide tubaire et la hausse du niveau d'E<sub>2</sub> circulant chez le babouin (Verhage et coll., 1990), le bovin (Boice et coll., 1990b; Wegner et Killian, 1992), l'ovine (Buhi et coll., 1991), et l'humain (O'Day-Bowman et coll., 1995). Plus récemment,

deux études chez le hamster ont démontré la capacité de l'E<sub>2</sub> à induire la synthèse de l'oviductine dans l'oviducte chez des femelles prépubères (Malette et coll., 1995; Abe et coll., 1998). Chez la souris, des études de transfections transitoires utilisant diverses portions de la région 5' flanquante ont montré que, dans des cellules exprimant l'ER, l'ERE du gène de l'oviductine de souris confère au gène rapporteur une susceptibilité à l'E<sub>2</sub> (Takahashi et coll., 2000). Les gènes d'oviductine de hamster et de souris possédant des EREs identiques et situés dans des localisations très similaires, on peut supposer que l'ERE du gène de l'oviductine de hamster est fort probablement fonctionnel. Toutefois, les résultats de Takahashi et coll. (2000) indiquent un rôle probable de plusieurs demi-EREs dans l'induction maximale de l'expression du gène rapporteur par l'E<sub>2</sub>.

Il y a quelques années, une étude, utilisant des cellules épithéliales tubaires fraîchement mises en culture, suggérait que c'est la LH, et non l'E<sub>2</sub>, qui régit l'expression de l'oviductine chez le bovin (Sun et coll., 1997). La LH agirait via la stabilisation de l'ARNm, et non en augmentant le taux de transcription du gène. Selon ces auteurs, l'apparente hausse dans la production de l'oviductine suite à la hausse du taux circulant d'E<sub>2</sub> ne serait que coïncidence; ce serait en fait l'augmentation concomitante du taux de LH qui causerait une plus grande production d'oviductine. Soulignons toutefois que les observations ne concernent que l'oviductine intracellulaire; une hausse équivalente dans le milieu de culture n'a jamais été observée. Ces auteurs ont même avancé que l'E<sub>2</sub> n'a aucun effet sur la production de l'oviductine bovine. Concluons en disant qu'un certain

manque de rigueur dans ces travaux suggère la plus grande prudence quant aux conclusions tirées par ces auteurs.

Lorsque l'on soumet la séquence de la région 5' flanquante proximale (i.e. nt -1 à -200) à une recherche plus poussée d'éléments de réponse potentiels, il n'y a qu'un site parfaitement consensus, soit un site inversé de liaison du facteur Sp1 situé entre le site d'initiation de la transcription et la boîte TATA non-consensus. Toutefois, il faut souligner que les séquences consensus doivent être vues comme des outils, et que peu d'éléments de réponses fonctionnels respectent parfaitement leur consensus respectifs. Ainsi, en allouant une divergence d'un nt par rapport aux consensus reconnus, plusieurs sites potentiels sont identifiés (fig. 12). On remarquera la concentration de plusieurs de ces sites potentiels à proximité de l'ERE, suggérant un rôle important de cette région dans le contrôle de la transcription. Pour le reste de la partie 5' flanquante, soulignons seulement la présence de six demi-EREs (fig. 11). Tenter d'identifier d'éventuels éléments pouvant régir la transcription du gène de l'oviductine, sans études fonctionnelles, ne donnerait lieu qu'à des spéculations.

La présence d'une région 5' NT très courte, et d'une boîte TATA non-consensus sans boîte CAAT à proximité nous ont incités à rechercher un deuxième site d'initiation de la transcription. Cependant, une extension de l'amorce a bel et bien confirmé qu'il n'y avait qu'un seul site d'initiation, situé 14 nt en amont du codon d'initiation. La taille moyenne des régions 5' NT étant d'environ 90 nt (Kozak 1991, et références incluses), il en découle que l'oviductine



possède une région 5' NT particulièrement courte. La présence d'un second codon ATG en phase avec le premier permet de croire qu'une région 5' NT si courte pourrait entraîner une défection partielle de la sous-unité 40 S du ribosome vers ce second ATG, produisant ainsi deux oviductines variant entre elles par leur extrémité N-terminale. Plusieurs arguments militent contre cette hypothèse. *Primo*, le deuxième ATG n'est pas situé dans un contexte favorable, tel que décrit par Kozak (1987); *secundo*, les travaux de Malette et coll. (1995b) sur les précurseurs de l'oviductine ont révélé deux formes différentes, ce qui s'accorde avec la nature polymorphique du gène; *tertio*, les résultats de microséquençage de la partie N-terminale de l'oviductine n'indiquent aucune variation (Malette et Bleau, 1993). Dès lors, une analyse sommaire des structures secondaires possibles de l'ARNm à proximité du site d'initiation de la transcription a été faite. La région allant de +1 à +40 nt peut potentiellement former plusieurs structures secondaires faibles, avec une énergie libre atteignant un maximum de -9,4 kcal/mol.

### **5.6- Analyse de la structure du gène**

La séquence codante du gène de l'oviductine de hamster est divisée en 11 exons (fig. 14), soit le même nombre que ceux des oviductines murine (Takahashi et coll., 2000; no. de référence de Genbank AF006193) et humaine (R. C. Jaffe, travaux non-publiés, no de référence de Genbank U58001-58009). En plus d'un nombre identique d'exons, la taille de chacun de ceux-ci est très bien conservée d'une espèce à l'autre (fig. 15). Si l'on ajoute à la

comparaison l'organisation des PACs *Ym1* (Jin et coll., 1998) et CHI3L1 (Rehli et coll., 1997), on peut observer que la taille des premiers exons montre un assez bon taux de conservation. À souligner, c'est à partir du dernier exon que les différences s'accroissent, ce qui appuie l'idée que l'oviductine pourrait bien être un hybride composé d'une partie mucine et d'une partie PAC. Une analyse de la fig. 15 montre que le gène murin *Ym1* est plus semblable aux gènes encodant les oviductines de hamster, d'humain et de souris, qu'au gène encodant la YKL-40 humaine (CHI3L1). *Ym1* possède le même nombre d'exons que les oviductines de hamster, humain et de souris, c'est-à-dire onze. Cinq des exons du gène *Ym1* ont exactement la même taille que les exons homologues chez les oviductines. La plupart des différences de taille sont assez minimes. Toutefois, chez *Ym1*, le onzième exon, avec 329 nt, a une taille beaucoup plus modeste, si on le compare avec ceux de l'oviductine de hamster (1183 nt), de souris (1009 nt) et humaine (1029 nt). Comme il s'avère que c'est justement le dernier exon qui comprend les répétitions en tandem conférant un caractère de mucine à l'oviductine, il semble donc que, tout comme lors de la comparaison des séquences nucléotidiques des ADNc, la similarité entre les gènes encodant les différentes oviductines et de *Ym1* s'arrête, *grosso modo*, à la partie du gène encodant la région apparentée aux chitinases. L'organisation du gène encodant CHI3L1, une protéine humaine de type chitinase ne possédant toutefois pas d'activité catalytique (Rehli et coll., 1997), présente déjà un profil plus distant de celui des oviductines. Le gène comprend dix exons, dont le dernier est, comme dans le cas des oviductines, le plus important en taille. Seulement deux exons ont la

même taille que leurs homologues chez les oviductines. Tel que résumé à la fig. 15, qui regroupe tous ces résultats, il semble que Ym1 soit apparenté de façon plus étroite aux oviductines que ne l'est CHI3L1.

## **5.7- Hypothèses sur le(s) rôle(s) biologique(s) de l'oviductine**

Plusieurs hypothèses ont été émises au fil des ans sur le rôle biologique de l'oviductine. Bien que ce rôle ne puisse toujours pas être avancé avec certitude, la connaissance de la séquence protéique et de la similarité de séquences ou de caractéristiques avec les chitinases et les mucines, respectivement, permet de revoir ces hypothèses sous un nouveau jour.

### **5.7.1- Protection de l'ovocyte/embryon et aiguillage de l'implantation vers l'utérus**

Dans le contexte d'un organe exposé à une multitude de conditions pathogènes, la présence dans l'oviducte d'une glycoprotéine possédant toutes les caractéristiques des mucines épithéliales dans le fluide tubaire suggère immédiatement un rôle de protection pour l'oviductine. De ce point de vue, l'oviductine jouerait alors un rôle plutôt passif, dicté par ses propriétés biochimiques particulières. Le fait de retrouver celle-ci dans la zone pellucide, à la surface de l'épithélium tubaire, et même, selon certains (voir plus bas), à la surface du spermatozoïde et de l'épithélium de l'endomètre, semble indiquer que l'oviductine est pour ainsi dire omniprésente dans

l'oviducte. La présence de nombreuses charges négatives, de même que l'absence de ponts disulfures intermoléculaires diminuent fortement la possibilité que l'oviductine puisse former un mucus gélatineux (Bleau et coll., 1999), par opposition à celui formé par la plupart des mucines épithéliales. L'hypothèse de notre équipe veut donc que l'oviductine, une fois associée à la ZP de l'ovocyte/embryon tubaire, permette, par répulsions électrostatiques due à ses nombreuses charges, de jouer un rôle d'antiadhésif empêchant l'implantation de l'embryon tubaire dans l'oviducte. Mentionnons d'ailleurs que l'embryon, avant de pouvoir s'implanter dans la paroi utérine, doit éclore, c'est-à-dire se défaire de la ZP qui l'entoure. À ce chapitre, il est bon de rappeler que l'espèce la plus susceptible aux grossesses ectopiques (i.e. l'humain) est aussi celle dont les fluctuations du taux d'oviductine sont les plus importantes au cours du cycle (voir la revue de la littérature sur les mucines de Van Klinken et coll., 1995). De surcroît, le hamster, avec l'oviductine mature comportant le plus haut taux de glycosylation et le taux basal d'oviductine le plus stable au cours du cycle sexuel, est pour ainsi dire exempt de grossesses ectopiques (aucun cas rapporté chez ce modèle animal en plus de 15 ans d'observations; Gilles Bleau, communication personnelle). Un tel rôle relativement passif expliquerait aussi pourquoi la fécondation *in vitro* (FIV), utilisant des ovocytes ovariens jamais exposés à des facteurs tubaires, est possible, quoique moins efficace que le processus de fécondation *in vivo*. D'un autre côté, l'oviductine pourrait peut-être jouer un rôle similaire à celui des mucines endothéliales, c'est-à-dire être une molécule de reconnaissance et d'adhésion. S'il est vrai, comme il le

semble, que l'oviductine s'associe à la membrane des blastomères de l'embryon, l'oviductine, lors de l'éclosion de la ZP à l'entrée de l'utérus, serait alors exposée et apte à reconnaître un éventuel récepteur exprimé par l'épithélium tubaire. L'aiguillage de l'implantation se ferait en deux volets: durant le transit tubaire, l'oviductine associée à la ZP jouerait le rôle d'antiadhésif, et, dans l'utérus, la portion de l'oviductine associée à la membrane des blastomères servirait de molécule de reconnaissance.

D'ailleurs, il a été suggéré que l'absence de sécrétion de MUC1 par les cellules de l'épithélium utérin dans les stades précoces de la grossesse favoriserait l'implantation de l'embryon (Surveyor et coll., 1995; Pimental et coll., 1996). MUC1 étant associée à la membrane, on peut dès lors penser qu'un éventuel "récepteur" utérin de l'oviductine associée à la surface des blastomères serait enfoui dans le mucus formé par MUC1. L'absence de synthèse de MUC1 offrirait une fenêtre d'exposition de ce "récepteur". D'un autre côté, Martoglio et Kan (1996) observent la présence d'oviductine à l'intérieur des cellules de l'épithélium utérin (pas de variations selon moment du cycle œstral), avec une baisse marquée aux jours 5 et 6 de la grossesse (moment où l'embryon s'implante dans l'utérus, selon les auteurs), particulièrement à proximité du site d'implantation; ils suggèrent donc un rôle de l'oviductine dans le contrôle de l'implantation, ainsi que la présence d'un récepteur spécifique à l'oviductine à la surface des cellules épithéliales utérines responsable de l'internalisation de l'oviductine. Il y aurait baisse de la production de celui-ci au moment de l'implantation. Finalement, Murakami et Imai

(1996) observent, chez le lapin, que l'épaisseur de la couche de mucine autour de l'embryon semble être importante pour sa survie.

#### 5.7.2- Association de l'oviductine à la surface du spermatozoïde

L'un des volets les plus actifs de la recherche du rôle biologique de l'oviductine traite de son association spécifique à la surface du spermatozoïde. Ainsi, on a très tôt observé la liaison de l'oviductine à la surface de la membrane du spermatozoïde homologue chez l'ovin (Sutton et coll., 1984b). Chez le hamster doré, Kimura et coll. (1994) suggèrent un rôle de l'oviductine dans l'interaction entre les gamètes mâle et femelle. D'ailleurs, cette hypothèse ramène la possibilité que l'oviductine se comporte comme une mucine endothéliale, c'est-à-dire comme une molécule de reconnaissance et/ou d'adhésion. King et Killian (1994), chez le bovin, observent aussi cette association oviductine-spermatozoïde, mais seulement s'il y a eu perméabilisation préalable de la membrane du spermatozoïde. Ces auteurs suggèrent une association possible avec des phospholipides membranaires du spermatozoïde après l'efflux de cholestérol dû à la capacitation.

Récemment, on a aussi identifié l'oviductine comme étant un facteur facilitant la pénétration du spermatozoïde chez le hamster (Boatman et coll., 1994b; Boatman et Magnoni, 1995) et chez l'humain (O'Day-Bowman et coll., 1996). Boatman et coll. (1994b) rapportent qu'il y aurait 3 facteurs présents dans l'ampoule qui faciliterait la pénétration de la ZP par le spermatozoïde: l'un des deux interagissant

avec la ZP serait l'oviductine. La même équipe (Boatman et coll., 1994a; Boatman et Magnoni, 1995) a aussi observé une pénétration facilitée par les spermatozoïdes après une exposition tubaire des ovocytes ovulés, ce qui avait déjà été observé, chez la même espèce, par Yang et Yanagimachi (1989). Qui plus est, l'oviductine pourrait elle-même se lier à la surface du spermatozoïde (Boatman et Magnoni, 1995). O'Day-Bowman et coll. (1996), ainsi que Schmidt et coll. (1997a), rapportent aussi une hausse du taux de pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde lors d'incubation incluant une oviductine et des spermatozoïdes homologues. La présence d'oviductines hétérologues diminue ce taux (Reuter et coll., 1994; O'Day-Bowman et coll., 1996; Hill et coll., 1997). Récemment, des travaux de King et coll. (1997) tendent à démontrer que l'oviductine pourrait faciliter la capacitation des spermatozoïdes bovins, alors que des travaux de Martus et coll. (1998) proposent un effet bénéfique de l'oviductine sur la liaison ovocyte-spermatozoïde, la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde, et la fécondation. Il est tentant de penser que les groupements glycosylés de l'oviductine puissent être impliqués dans un processus de reconnaissance du spermatozoïde homologue. Par contre, Reuter et coll. (1994) n'observent pas la liaison de l'oviductine humaine aux spermatozoïdes humains même après perméabilisation de la membrane.

Sakai et coll. (1988), de même que Schmidt et coll. (1997b) observent une forte baisse du nombre de spermatozoïdes liés aux ovocytes tubaires lorsque ceux-ci ont préalablement été mis en présence d'anticorps anti-oviductine. Ces deux équipes suggèrent

donc un rôle de l'oviductine dans l'interaction des gamètes, sans toutefois considérer que cette baisse de la liaison puisse être due à un encombrement stérique causé par un grand nombre de molécules d'Ig, qui pourrait ainsi empêcher le spermatozoïde de lier son (ses) véritable(s) "récepteur(s)". Notons que l'ajout d'une glycoprotéine à l'ovocyte, modifiant la facilité avec laquelle le spermatozoïde pénètre l'ovule, pourrait être un phénomène répandu. En effet, Yoshizaki et Katagiri (1981), chez la grenouille *Rana japonica*, observent l'ajout d'une glycoprotéine sécrétée par la *pars recta* de l'oviducte (partie anatomiquement adjacente à l'ostium) à la couche vitelline entourant l'ovocyte. Cet ajout semble ramollir la couche vitelline, condition nécessaire à la fécondation d'ovocytes sans couche de gélatine. Il est cependant à noter qu'aucune similitude de séquence n'est à ce jour connue entre les oviductines et des glycoprotéines de batraciens.

Le travail de Yang et Yanagimachi (1989), brièvement mentionné plus haut, est presque certainement à l'origine de l'engouement, pour ne pas dire de l'acharnement, avec lequel on étudie une possible relation oviductine-spermatozoïde. Cette publication rapporte de nombreuses observations tendant à démontrer que les ovocytes tubaires sont plus matures que les ovocytes ovariens, entre autre au niveau de la capacité à induire la réaction de l'acrosome, de la facilité de pénétration par le spermatozoïde, d'une méiose complétée plus rapidement chez les ovocytes tubaires après activation par spermatozoïde, de la susceptibilité aux ionophores à calcium, etc. Rappelons que, bien que Bavister ait démontré que la FIV puisse se faire avec un ratio spermatozoïde-ovocyte près de l'unité



(Bavister, 1979), c'est-à-dire semblable à ce que l'on observe *in vivo*, le ratio utilisé généralement pour obtenir une fécondation *in vitro* réussie est de l'ordre de 100 à 1000. Un rôle facilitateur de l'oviductine serait donc plausible. Dernièrement, un travail de Kouba et coll. (2000) attribue à l'oviductine un rôle dans le contrôle du nombre de spermatozoïdes liés à la ZP.

À ce point-ci, il est intéressant de rappeler que la similarité de l'oviductine avec les chitinases pourrait expliquer son association avec la surface du spermatozoïde, qui comporte de nombreuses glycoprotéines de surface. Toutefois, on ne peut avancer plus avant un rôle biologique de l'oviductine en se basant uniquement sur la séquence protéique déduite.

#### 5.7.3- Inhibition du système immunitaire maternel dans l'oviducte

L'une des hypothèses les plus originales suggère que l'oviductine puisse être impliquée dans l'inhibition du système immunitaire maternel dans la trompe, afin de protéger l'embryon (Oliphant et coll., 1984a; Thomas et coll., 1991). Il est connu depuis longtemps que le fluide tubaire contient à la fois des Ig et des membres de la cascade du complément, en concentrations suffisantes pour pouvoir agir. Les travaux d'Oliphant chez le lapin montrent que l'activité inhibant le complément co-élue, par filtration sur gel, avec un groupe de protéines, dont plus de 75% est constitué d'une glycoprotéine sulfatée de 72 kDa, ce qui correspond exactement à

l'oviductine de lapin que ces auteurs avaient préalablement purifiée utilisant les mêmes méthodes (filtration sur gel Sephadex G-200 + chromatographie à échangeuse d'ions DEAE Sephadex A-25; Oliphant et coll., 1982). L'étude du groupe de Thomas (1991) utilise la SOG (*Sulfated Oviductal Glycoprotein*) purifiée, et observe que cette dernière inhibe la voie classique du complément, mais pas la voie alternative. Par conséquent, ils en déduisent que la SOG inhibe la voie classique du complément dans ses 4 premières étapes (activation des composantes C1, C4 et C3), qui ne sont pas communes avec la voie alternative. Incidemment, la voie classique est celle qui nécessite la participation d'un complexe antigène-anticorps, alors que la voie alternative est déclenchée par certains sucres portés par des agents pathogènes... Ce mécanisme de protection de l'environnement tubaire implique une capacité, pour le système immunitaire maternel, à discerner entre deux types de groupements glycosylés du non-soi, c'est-à-dire ceux présentés par le spermatozoïde, et ceux présentés par d'éventuels agents pathogènes. Encore une fois, on peut constater l'importance des groupements glycosylés dans le contexte de la reproduction. De toute évidence, le grand nombre de combinaisons possibles de structures différentes que peuvent adopter les groupements glycosylés serait en mesure d'offrir aux gamètes le potentiel de produire des molécules qui leur sont uniques, les distinguant ainsi de leur environnement.

Dans le cas de cette hypothèse, c'est l'importante glycosylation de l'oviductine qui pourrait expliquer un tel rôle biologique. De plus, la possibilité de lier des groupements glycosylés suggérée par sa ressemblance avec les chitinases pourrait aussi expliquer la liaison de l'oviductine à l'ovocyte/embryon. Ainsi, l'oviductine pourrait camoufler la présence à la fois des spermatozoïdes et de l'embryon au système immunitaire maternel et permettre un transit tubaire sans risque.

#### 5.7.4- Sélection des spermatozoïdes et blocage de l'isthme

Cette hypothèse se base aussi sur un rôle plutôt mécanique que biochimique, et n'inclut pas uniquement l'oviductine. Ce modèle suppose que le mucus présent dans l'isthme permet de trier les spermatozoïdes, afin que seuls les meilleurs candidats atteignent l'ampoule, lieu de la fécondation (Jansen, 1978; 1980; 1982; 1983). À la différence de la technique de nage ascendante utilisée en FIV, la sélection pourrait très bien se faire sur des critères autres que seulement la motilité, par exemple en facilitant la capacitation de certains spermatozoïdes.

Une autre hypothèse du même type suggère que le mucus servirait à retarder l'entrée de l'ovocyte dans l'isthme (Koester, 1969). Le mucus, ainsi qu'un rétrécissement de l'isthme par contractions des couches musculaires, empêcherait l'entrée de l'ovocyte dans l'isthme et retarderait ce dernier dans l'ampoule. Si l'on combine cette hypothèse avec celle du tri des spermatozoïdes, on obtient un modèle qui permet d'expliquer comment les gamètes mâles et femelles,

présents en même temps dans l'oviducte peuvent se mouvoir dans des directions opposées. Ces deux hypothèses sont très compatibles avec la similarité de caractéristiques de l'oviductine avec les mucines. Ces rôles, plutôt passifs, sont également compatibles avec les rôles suggérés par notre équipe.

#### 5.7.5- Contrôle de la division embryonnaire

Cette hypothèse est fondée sur un certain nombre de travaux qui rapportent l'observation d'oviductine à l'intérieur de l'ovocyte fécondé et de l'embryon. Gandolfi et coll. (1989) observent que l'oviductine peut s'associer à la surface de la membrane embryonnaire, et peut-être même dans le cytoplasme des blastomères ovins. Leur conclusion est basée sur le fait qu'un homogénat de blastomères, dénudés de leur ZP, contient une protéine reconnue par un anticorps monoclonal anti-oviductine ovine. Peu après, des observations similaires sont faites chez le babouin (Boice et coll., 1990a), cette fois par immunocytochimie à l'or colloïdal. Ces auteurs soulignent toutefois que le marquage est faible, mais supérieur au bruit de fond. Buhi et coll. (1993), chez le porc, détectent par le même type de technique que l'oviductine peut s'associer aux microvillosités et à la membrane vitellines, de même qu'à la surface des blastomères et entre ceux-ci. Kan et Roux (1993), utilisant aussi la microscopie électronique, observent la présence d'oviductine de hamster à l'intérieur de compartiments endocytiques tels des *coated pits* et des vésicules recouvertes de clathrine (*coated vesicles*). Ces auteurs suggèrent l'internalisation, puis la dégradation, dans les lysosomes, de

l'oviductine. Il n'est toutefois pas établi si l'internalisation se fait par l'entremise d'un récepteur à oviductine. Soulignons toutefois qu'il est aujourd'hui connu que l'anticorps monoclonal utilisé pour ces travaux reconnaît un épitope glycosylé. Les travaux de Murray et Messinger, eux, démontrent un gradient d'association de l'oviductine à la surface des blastomères durant les premières divisions cellulaires. Au stade 2-cellules de l'embryon, la distribution de l'oviductine est diamétralement opposée à celle de l'actine, mais pour les stades 4- et 8-cellules, ces deux protagonistes sont retrouvés dans des localisations identiques. Les auteurs suggèrent un rôle dans le positionnement des blastomères. Notons qu'à l'encontre des travaux de Kan et Roux (1993) et de Boice et coll. (1990), Murray et Messinger (1994) n'observent pas la présence d'oviductine dans le cytoplasme des blastomères.

À supposer que l'oviductine est bien internalisée, il faudrait répondre à une importante question: l'internalisation serait-elle à médiation par un récepteur à oviductine spécifique, à la surface de l'ovocyte, ou l'oviductine serait-elle internalisée en même temps que d'autres molécules, vu son omniprésence dans le fluide tubaire? N'oublions pas que de nombreuses études ont démontré que l'oviductine est observée dans l'espace périvitellin; chez la souris, il a même été proposé que c'est là le seul lieu où l'on retrouve de l'oviductine, excluant même la ZP (Kapur et Johnson, 1986). Néanmoins, une telle internalisation procurerait un moyen de communication mère-fœtus, par exemple sur la vitesse de développement optimale à suivre. La FIV n'aurait pas besoin

d'oviductine, vu que "le laboratoire" se charge de contrôler l'aspect temporel... D'un autre côté, il a été rapporté chez *Saccharomyces cerevisiae* que la chitinase, une glycoprotéine sécrétée, est nécessaire à la séparation des cellules mère et fille (Kuranda et Robbins, 1991). Rappelons toutefois que l'oviductine ne possède pas d'activité chitinolytique; cependant, on peut concevoir que l'oviductine représente un produit de l'évolution d'une chitinase ancestrale impliquée dans le processus global de la fécondation, ou dans un spectre plus large, celui de la transmission du matériel génétique. Bareither et Verhage (1981) avancent l'hypothèse que le fameux produit de sécrétion des cellules non-ciliées de l'épithélium tubaire pourrait inhiber le développement embryonnaire. Par conséquent, l'inhibition marquée de la synthèse et de la sécrétion de ce produit par la progestérone servirait à synchroniser le développement embryonnaire avec la préparation de l'endomètre pour l'implantation, préparation dépendante de la progestérone.

Toutefois, si l'on accorde des propriétés embryotropes ou anti-embryotropes quelconques à l'oviductine, le besoin d'un stricte contrôle exercé au niveau du tissu d'expression, et, chez certaines espèces, au niveau temporel de son expression, devient plus compréhensible. Encore une fois, la FIV indique que l'oviductine, pour peu qu'elle possède de telles propriétés, serait plutôt anti-embryotrope, puisque sa présence ne semble pas indispensable à la fécondation. Notons toutefois que ce rôle biologique ne peut pas être confirmé ou infirmé par la seule séquence protéique déduite, et que

seules des études fonctionnelles poussées pourraient résoudre un tel rôle de l'oviductine

### **5.8- Culture d'ovocytes/embryons en présence de facteurs tubaires**

Plusieurs auteurs ont déployé des efforts soutenus dans ce domaine de la recherche en reproduction. Un nombre impressionnant de travaux visent en effet à identifier un ou plusieurs facteurs du fluide tubaire pouvant expliquer la plus grande efficacité du processus de fécondation *in vivo* par rapport à la FIV. Selon plusieurs de ces travaux (résumés dans la revue de Bavister, 1988), l'apport de l'oviducte n'est pas spécifique à l'espèce, c'est-à-dire que l'on peut observer un effet bénéfique, par exemple, en cultivant un ovocyte fécondé dans un oviducte hétérologue. La vaste majorité de ces travaux indiquent un effet bénéfique de la culture d'embryon en présence de cellules de l'épithélium tubaire, notamment sur le taux de clivage (Gandolfi et Moor, 1987; Rexroad et Powell, 1988) et du nombre de blastomères formés (Carney et coll., 1990a). Soulignons que les travaux de Gandolfi (1987) ont montré que l'effet bénéfique disparaît si l'on remplace les cellules épithéliales tubaires par des fibroblastes. D'autres avancent plutôt pour les cellules épithéliales tubaires un rôle dans la détoxification (Carney et coll., 1990b) ou le contrôle de la pression partielle d'oxygène (Nancarrow et Hill, 1994) dans le fluide tubaire. Ces mêmes auteurs suggéreront par la suite un rôle des protéines tubaires dans la facilitation de la fécondation et/ou

la sélection des ovocytes fécondés qui atteindront la première division (Nancarrow et Hill, 1995).



## 6. Conclusions et perspectives

L'impact de l'élucidation des séquences nucléotidique et peptidique de l'oviductine de hamster, de même que celle de la structure du gène l'encodant, se fera ressentir différemment à court, moyen et long terme sur la recherche du rôle biologique de l'oviductine en général.

À court terme, ces études permettront - si ce n'est déjà fait - d'affilier de façon de plus en plus certaine l'oviductine à une famille de protéines, et ainsi d'apporter d'importants éléments quant aux voies à suivre dans l'étude de cette glycoprotéine tubaire. La recherche de protéines similaires peut en effet fournir de nombreux renseignements quant à la structure tertiaire de l'oviductine, l'identification de résidus ou de domaines importants. À cet effet, la similitude de séquence avec les chitinases et l'identification de régions riches en résidus P, T et S sont certainement les éléments les plus significatifs. Il est d'ailleurs à la fois intéressant et décevant d'observer que l'oviductine semble faire partie d'une nouvelle famille apparentée aux chitinases: intéressant parce que la perspective de nouveaux horizons est toujours enthousiasmante, et décevant parce que cela reporte à plus tard l'élucidation du rôle biologique de l'oviductine.

À moyen terme, la mise à jour de la séquence de la région 5' flanquante permettra d'identifier les éléments impliqués dans le contrôle de l'expression, qu'elle soit tissulaire et/ou temporelle. La spécificité s'explique-t-elle par la présence dans les cellules épithéliales d'un facteur de transcription spécifique, par la collaboration de plusieurs éléments communs, ou encore par l'existence de conditions inhibitrices dans les autres tissus? Pourquoi observe-t-on une spécificité tissulaire aussi stricte? L'ERE et la boîte TATA non-consensus sont-ils impliqués dans ce processus de l'induction de la transcription? Sans l'ombre d'un doute, les réponses à ces importantes questions nécessiteront des études fonctionnelles par transfection transitoire, retards sur gel et autres méthodes permettant de décortiquer la région 5' flanquante.

Il ne faut toutefois pas oublier que le but principal de toutes les recherches actuelles vise à identifier le rôle biologique de l'oviductine, ainsi que les protagonistes impliqués dans le mécanisme ou la cascade dont elle fait partie. La connaissance de la séquence peptidique de l'oviductine est donc indispensable, surtout si l'on considère l'étroite relation entre les structures tertiaire et quaternaire d'une protéine et la fonction de celle-ci. L'oviductine joue-t-elle un rôle unique, indispensable? Si oui, en quoi affecte-t-elle le processus global de la reproduction? Comment expliquer que certaines espèces de mammifères, tel le cheval, ne semble pas produire de protéine homologue? Si son rôle n'est ni unique, ni indispensable, comment expliquer la stricte spécificité tissulaire d'expression? Il sera également intéressant de voir comment on pourra concilier deux

observations apparemment contradictoires, à savoir la conservation de l'oviductine chez la plupart des mammifères étudiés, suggérant un rôle biologique important dans le processus de fécondation et/ou le développement embryonnaire, et le fait que la FIV puisse mener à l'obtention d'êtres vivants en apparence normaux et en santé.

Bien que les travaux présentés dans cette thèse ne puissent prétendre donner réponse à toutes les questions laissées en suspens, ils ont permis d'amasser de nombreux indices me permettant, en toute modestie, d'avancer une hypothèse quant au rôle biologique de l'oviductine. Pour des raisons discutées en plus amples détails dans la discussion, je crois que le rôle de protection de l'ovocyte/embryon tubaire et d'aiguillage de l'implantation vers l'utérus, formulé par notre équipe, est le plus acceptable. La similitude de séquence avec les chitinases et la communauté de caractéristiques avec les mucines cadrent bien avec une protéine devant potentiellement s'associer à une structure composée de glycoprotéines, la ZP, (grâce à son "domaine" de type chitinase), et former une couche protectrice et antiadhésive (grâce à son "domaine" de type mucine). Ce rôle, dispensable pour le processus global de la fécondation, n'en apporterait pas moins un avantage considérable si l'on tient compte de la somme d'énergie investie par les organismes vivants afin de promouvoir le transfert du bagage génétique. Un taux de survie supérieur de l'embryon tubaire, de même que la réduction des complications pouvant survenir pendant la grossesse, assureraient une plus grande efficacité de la reproduction.

## 7. Bibliographie

Abe H, Oikawa T. 1990. Ultrastructural evidence for an association between an oviductal glycoprotein and the zona pellucida of the golden hamster egg. *J Exp Zool.* 256:210-221.

Abe H, Oikawa T. 1991. Immunocytochemical localization of an oviductal zona pellucida glycoprotein in the oviductal epithelium of the golden hamster. *Anat Rec* 229:305-314.

Abe H, Ookata K, Abe M, Oikawa T. 1992. Immunological characterization of oviductal glycoproteins associated with the zona pellucida of the golden hamster egg. *J Exp Zool* 262:209-218.

Abe H, Satoh T, Hoshi H. 1998. Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. *J Reprod Fertil* 112:157-163.

Allen A. 1978. Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus. *Br Med Bull* 34:28-33.

Altschull SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Altschull SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.

Araki Y, Kurata S, Oikawa T, Yamashita T, Hiroi M, Naiki M, Sendo F. 1987. A monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. *J Reprod Immunol* 11:193-208.

Arias EB, Verhage HG, Jaffe RC. 1994. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal cDNA. *Biol Reprod* 51:685-694.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, éditeurs. 1988. "Current Protocols in Molecular Biology". New-York: John Wiley and sons.

Bareither ML, Verhage HG. 1981. Control of secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. *Am J Anat* 162:107-118.

Barr Sh, Oliphant G. 1981. Sulfate incorporation into macromolecules produced by cultured oviductal epithelium. *Biol Reprod* 24:828-858.

Battalia DE, Yanagimachi R. 1979. Enhanced and co-ordinated movement of the hamster oviduct during the periovulatory period. *J Reprod Fert* 56:515-520.

- Bavister BD. 1979. Fertilization of hamster eggs in vitro at sperm:egg ratios close to unity. *J Exp Zool* 210:259-264.
- Bavister B. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 29:143-154.
- Bishop DW. 1956. Active secretion in the rabbit oviduct. *Am J Physiol* 187:347-352.
- Bivin SW, Olsen GA, Murray KA. 1987. Morphophysiology. In: Van Hoosier GL Jr, McPherson CW, éditeurs. "Laboratory Hamsters". Orlando: Academic Press. pp. 9-41.
- Bleau G, Richer C-L, Bousquet D. Absence of dynein arms in cilia of endocervical cells in a fertile woman. *Fertil Steril* 30:362-363.
- Bleau G, St-Jacques S. 1988. Transfert of oviductal proteins to the zona pellucida. In: J Dielt ,éditeur. "Structure and function of the mammalian egg coat". New-York: Springer-Verlag. pp. 99-110.
- Bleau G, Massicotte F, Merlen Y, Boisvert C. 1999. Chitinase-like proteins. In: Jollès P, Muzzarelli RAA, éditeurs. "Chitin and Chitinases". Basel: Birkhauser. pp. 211-221.
- Boatman DE, Felson SE, Kimura J. 1994a. Changes in morphology, sperm penetration and fertilization of ovulated hamster eggs induced by oviductal exposure. *Hum Reprod* 9:519-526.

Boatman DE, Magnoni GE, Robbins RS. 1994b. Modulation of spermatozoa and zona pellucida properties by the soluble acrosome reaction-inducing factor of the ovulated egg-cumulus complex. *Mol Reprod Dev* 38:410-420.

Boatman DE, Magnoni GE. 1995. Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. *Biol Reprod* 52:199-207.

Boatman, DE. 1997. Responses of gametes to the oviductal environment. *Hum Reprod* 12 Natl Suppl. *JFBS* 2:133-149.

Boice ML, McCarthy TJ, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG. 1990a. Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 43:340-346.

Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG. 1990b. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod* 43:457-465.

Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ, Aerts JMFG. 1995. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* 270:26252-26256.

Borell U, Nilsson O, Wersäll J, Westman A. 1956. Electron microscope studies of the epithelium of the rabbit fallopian tube under different hormonal influences. *Acta Obstet Gynec Scand* 35:35-41.

Breathnach R, Benoist C, O'Hare K, Gannon F, Chambon P. 1978. Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4853-4857.

Brower LK, Anderson E. 1969. Cytological events associated with the secretory process in the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 1:130-148.

Brown CR, Cheng WKT. 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 92:183-191.

Buhi WC, Bazer FW, Alvarez IM, Mirando MA. 1991. *In vitro* synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 $\beta$ -estradiol-treated ovariectomized ewes. *Endocrinology* 128:3086-3095.

Buhi WC, O'Brien B, Alvarez IM, Erdos G, Dubois D. 1993. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod* 48:1274-1283.

Buhi WC, Alvarez IM, Choi I, Cleaver BD, Simmen FA. 1996. Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod* 55:1305-1314.

Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ. 1999. Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* 166:165-179.



Carney EW, Tobback C, Foote RH. 1990a. Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:629-635.

Carney EW, Tobback C, Foote RH. 1990b. Co-culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. *Mol Reprod Dev* 27:209-215.

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K. 1993. Plant chitinases. *Plant J* 3:31-40.

Crespeau F, Mialot M. 1979. Structure histologique de l'oviducte des mammifères. In: Société nationale pour l'étude de la stérilité et de la fécondité, éditeur. "Oviducte et fertilité". Paris: Masson. pp.51-63.

DeSouza MM, Murray MK. 1995a. An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* 136:2485-2496.

DeSouza MM, Murray MK. 1995b. An estrogen-dependent sheep oviductal glycoprotein has glycan linkages typical of sialomucins and does not contain chitinase activity. *Biol Reprod* 53:1517-1526.

Donnelly KM, Fazleabas AT, Verhage HG, Mavrogianis PA, Jaffe RC. 1991. Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. Mol Endocrinol 5:356-364.

Driancourt MA, Royère D, Hédon B, Levasseur M-C. 1991. Cycles œstriens et cycles menstruels. In: Thibault C, Levasseur M-C, éditeurs. "La reproduction chez les mammifères et l'homme". Paris: INRA Ellipses. pp. 573-587.

Erickson-Lawrence MF, Turner TT, Ross P, Thomas TS, Oliphant G. 1989. Sulfated oviductal glycoproteins in the rabbit: quantitation by competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Biol Reprod 40:1299-1310.

Fazleabas AT, Verhage HG. 1986. The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). Biol Reprod 35:455-462.

Feigelson M, Kay E. 1972. Protein patterns of rabbit oviducal fluid. Biol Reprod 6:244-252.

Flickinger GL, Elsner C, Illingworth DV, Muechler EK, Mikhail G. 1977. Estrogen and progesterone receptors in the female genital tract of humans and monkeys. Ann NY Acad Sci 286:180-189.

Fox LL, Shivers CA. 1975a. Detection and localization of specific antigens in the reproductive tracts of cycling, pregnant, and ovariectomized hamsters. *Fertil Steril* 26:579-598.

Fox LL, Shivers CA. 1975b. Immunologic evidence for addition of oviductal components to the hamster zona pellucida. *Fertil Steril* 26:599-608.

Freeman, ME. 1994. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: E Knobil, JD Neil, éditeurs. "The Physiology of Reproduction". Second Edition. New-York: Raven Press. Vol. 2 pp. 613-658.

Gandolfi F, Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviductal epithelial cells. *J Reprod Fert* 81:23-28.

Gandolfi F, Brevini TAL, Richardson L, Brown CR, Moor RM. 1989. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 106:303-312.

Gandolfi F, Modena S, Brevini TAL, Galli C, Moor RM, Lauria M. 1991. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomere membrane of sheep embryos. *Eur J Bas Appl Histochem* 35:383-392.

Gendler SJ, Spicer AP. 1995. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 57:607-34.

Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, Pudney J, Anderson DJ, Toribara NW, Hill III JA. 1997. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod* 56:999-1011.

Gothié S, Moricard, R. 1955. Étude sur la répartition du S<sup>35</sup> dans la trompe. Perméabilité de la membrane pellucide de l'oeuf fécondé intratubaire. *CR Séances Soc Biol* 145:2084-2087.

Gozia O, Ciopraga J, Bentia T, Lungu M, Zamfirescu I, Tudor R, Roseanu A, Nitu F. 1993. Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. *C R Acad Sci Paris* 316:788-792.

Greenwald GS. 1958. Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelium of the rabbit. *Anat Rec* 130:477-488.

Guyton AC, Hall JE. 1996. *Textbook of medical physiology*. Neuvième édition. Philadelphie: Saunders. pp. 1017-1032.

Hotchkiss J, Knobil E. 1994. The Menstrual Cycle and Its Neuroendocrine Control. In: E Knobil, JD Neil, éditeurs. "The Physiology of Reproduction". Second Edition. New-York: Raven Press.

Gum Jr JR. 1995. Human mucin glycoproteins: varied structures predict diverse properties and specific functions. *Biochem Soc Trans* 23:795-799.

Hadek R. 1953. Mucin secretion in the ewe's oviduct. *Nature* 171:750.

Hadek R. 1955. The secretory process in the sheep's oviduct. *Anat Rec* 121:187-205.

Hakala BE, White C, Recklies A. 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 268:25803-25810.

Hamner CE. 1971. Composition of oviductal and uterine fluids. *Adv Biosci* 6:143-164.

Hanscom DR, Oliphant G. 1976. Hormonal regulation of incorporation of  $^{35}\text{S}$  into macromolecules of oviduct fluid. *Biol Reprod* 14:599-604.

Hecker KH, Roux KH. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 20:478-485.

Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280:309-316.

Hill JL, Wade MG, Nancarrow CD, Kelleher DL, Boland MP. 1997. Influence of ovine oviductal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 47:164-169.

Hollis DE, Frith PA, Vaughan JD, Chapman RE, Nancarrow CD. 1984. Ultrastructural changes in the oviductal epithelium of merino ewes during the estrous cycle. *Am J Anat* 171:441-456.

Hunter RHF, Cook B, Poyser NL. 1983. Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *Eur J Obstet Gynecol reprod Biol* 14:225-232.

Hunter RHF. 1988. Development of the fallopian tubes and their functional anatomy. In: RHF Hunter, éditeur: "The Fallopian Tubes. Their Role in Fertility and Infertility." New-York: Springer-Verlag, pp. 12-29.

Hyde BA, Black DL. 1986. Synthesis and secretion of sulfated glycoproteins by rabbit oviduct explants *in vitro*. *J Reprod Fert* 78:83-91.

Idris N, Carraway L. 1999. Sialomucin complex (Muc4) expression in the rat female reproductive tract. *Biol Reprod* 61:1431-1438.

Iwahana H, Tsujisawa T, Katashima R, Yoshimoto K, Itakura M. 1994. PCR with end-trimming and cassette ligation: a rapid method to clone exon-intron boundaries and a 5'-upstream sequence of genomic DNA based on a cDNA sequence. *PCR Methods Appl* 1:19-25.

Jaffe RC, Arias EB, O'Day-Bowman MB, Donnelly KM, Mavrogianis PA, Verhage HG. 1996. Regional distribution and hormonal control of estrogen-dependent oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 55:421-426.

Jansen RPS. 1978 Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport. *Science* 201:349-351.

Jansen RPS. 1980. Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *Am J Obstet Gynecol* 136:292-308.

Jansen RPS, Bajpai VK. 1982. Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol Reprod* 26:155-168.

Jansen RPS, Bajpai VK. 1983. Periovulatory glycoprotein secretion in the macaque fallopian tube. *Am J Obstet Gynecol* 147:598-608.

Jansen RPS. 1995. Ultrastructure and histochemistry of acid mucus glycoproteins in the estrous mammal oviduct. *Microsc Res Tech* 32:29-49.

Jean Y, Langlais J, Roberts KD, Chapdelaine A, Bleau G. Fertility of a woman with nonfunctional ciliated cells in the fallopian tubes. *Fertil Steril* 31:349-350.

Jin HM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Kirkpatrick RB, Rosenberg M. 1998. Genetic characterization of the murine Ym1 gene and identification of a cluster of highly homologous genes. *Genomics* 54:316-322.

Kan FWK, St-Jacques S, Bleau G. 1988. Immunoelectron microscopic localization of an oviductal antigen in hamster zona pellucida by use of a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 36:1441-1447.

Kan FWK, St-Jacques S, Bleau G. 1989. Immunocytochemical evidence for the transfert of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biol Reprod* 40:585-598.

Kan FWK, Roux E, St-Jacques S, Bleau G. 1990. Demonstration by lectin-gold cytochemistry of transfert of glycoconjugates of oviductal origin to the zona pellucida of oocytes after ovulation in hamsters. *Anat Rec* 226:37-47.



Kan FWK, Roux E, Bleau G. 1993. Immunolocalization of oviductin in endocytic compartments in the blastomeres of developing embryos in the golden hamster. *Biol Reprod* 48:77-88.

Kan FWK, Roux E. 1995. Elaboration of an oviductin by the oviductal epithelium in relation to embryo development as visualized by immunocytochemistry. *Microsc Res Tech* 31:478-487.

Kapur RP, Johnson LV. 1985. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev Biol* 112:89-93.

Kapur RP, Johnson LV. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J Exp Zool* 238:249-260.

Kapur RP, Johnson LV. 1988. Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. *Anat Rec* 221:720-729.

Kimura H, Matsuda J, Ogura A, Asano T, Naiki M. 1994. Affinity binding of hamster oviductin to spermatozoa and its influence on in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 39:322-327.

King RS, Killian GJ. 1994. Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod* 51:34-42.

King RS, Anderson SH, Killian GJ. 1994. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Andrology* 15:468-478.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. 1986. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46:1053-1061.

Koester H. 1969. Tubal secretion and egg development. *Adv Biosci* 4:181-198.

Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Buhi WC. 2000. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biol Reprod* 63:242-250.

Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-8148.

Kozak M. 1991. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expression* 1:111-115.

Kuranda MJ, Robbins PW. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266:19758-19767.

Lagow E, DeSouza MM, Carson, DD. 1999. Mammalian reproductive tract mucins. *Hum Reprod Update* 5:280-292.

Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebricht RH. 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Gene Dev* 12:34-44.

Lapensée L, Paquette Y, Bleau G. 1997. Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (*MUC9*). *Fertil Steril* 68:702-708.

Léveillé M-C, Roberts KD, Chevalier S, Chapdelaine A, Bleau G. 1987. Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 36:227-238.

Lippes J, Enders RG, Pragay DA, Bartholomew WR. 1972. The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception* 5:85-103.

Lisk, RD. 1985. The estrous cycle. In: Siegel, HI éditeur. "The hamster reproduction and behaviour". New-York: Plenum Press. pp. 23-51.

Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC. 1988. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J Exp Zool* 248:345-353.

Malette B, Bleau G 1993. Biochemical characterization of hamster oviductin as a sulfated zona pellucida-binding glycoprotein. *Biochem J* 295:437-445.

Malette B, Filion B, St-Jacques S, Kan FW, Bleau G. 1995a. Hormonal control of the biosynthesis of hamster oviductin. *Microsc Res Tech* 31:470-477.

Malette B, Paquette Y, Bleau G. 1995b. Size variations in the mucin-type domain of hamster oviductin: identification of the polypeptide precursors and characterization of their biosynthetic maturation. *Biol Reprod* 53:1311-1323.

Malette B, Paquette Y, Merlen Y, Bleau G. 1995c. Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 41:384-397.

Marcus SL, Saravis CA. 1965. Oviduct fluid in the rhesus monkey: a study of its protein components and its origin. *Fertil Steril* 16:785-794.

Marshall JTA, Nancarrow CD, Broenlee AG. 1996. Cloning and sequencing of a cDNA encoding an ovine oestrus-associated oviducal protein. *Reprod Fertil Dev* 8:305-310.

Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA, Thibodeaux JK. 1998. Enhancement of bovine oocyte fertilization *in vitro* with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fert* 113:323-329.

Mastroianni Jr L, Urzua M, Stambaugh R. 1970. Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. *Fertil Steril* 21:817-820.

McComb P, Langley L, Villalon M, Verdugo P. 1986. The oviductal cilia and Kartagener's syndrome. *Fertil Steril* 46:412-416.

Ménézo Y, Guérin P. 1997. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 73:99-104.

Merlen Y, Bleau G. 2000. Organization of a gene coding for an oviduct-specific glycoprotein (oviductin) in the hamster. *Mol Reprod Dev* 57:238-246.

Moghissi KS. 1970. Human fallopian tube fluid. I. Protein composition. *Fertil Steril* 21:821-829.

Murakami H, Imai H. 1996. Successful implantation of *in vitro* cultured rabbit embryos after uterine transfert: a role for mucin. *Mol Reprod Dev* 43:167-170.

Murphy MR. 1985. History of the capture and domestication of the syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse) . In: HI Siegel ,éditeur. "The hamster: reproduction and behaviour". New-York: Plenum Press. pp. 3-20.

Murray MK, Messinger SM. 1994. Early embryonic development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is accompanied by alterations in the distribution and intensity of an estrogen (E2)-dependent oviduct glycoprotein in the blastomere membrane and zona pellucida and its association with F-actin. Biol Reprod 51:1126-1139.

Murray MK, DeSouza MM. 1995. Messenger RNA encoding an estrogen-dependent oviduct secretory protein in the sheep is localized in the apical tips and basal compartments of fimbriae and ampulla epithelial cells implying translation at unique cytoplasmic foci. Mol Rprod Dev 42:268-283.

Nancarrow CD, Hill JL. 1994. Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. Cell Biol Int 18:1105-1114.

Nancarrow CD, Hill JL. 1995. Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. J Reprod Fert 49:3-13.

Natraj U. 1999. Partial cloning of a cDNA encoding bonnet monkey (*Macaca radiata*) oviduct specific protein. Indian J Exp Biol 37:900-903.

Noske IG, Daniel Jr JC. 1974. Changes in uterine and oviducal fluid proteins during early pregnancy in the golden hamster. *J Reprod Fert* 38:173-176.

Nyirkos P, Golds EE. 1990. Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period. *Biochem J* 268:265-268.

O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG. 1995. A human oviduct-specific glycoprotein: synthesis, secretion and localization during the menstrual cycle. *Microsc Res Tech* 32:57-69.

O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Reuter LM, Johnson DE, Fazleabas AT, Verhage HG. 1996. Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation. *Biol Reprod* 54:60-69.

Oikawa T, Sendai Y, Kurata S, Yanagimachi R. 1988. A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Res* 19:113-122.

Oliphant G, Bowling A, Eng LA, Keen S, Randall PA. 1978. The permeability of rabbit oviduct to proteins present in the serum. *Biol Reprod* 18:516-520.

Oliphant G, Ross PR. 1982. Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 26:537-544.

Oliphant G, Cabot C, Ross P, Marta J. 1984a. Control of the humoral immune system within the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 31:205-212.

Oliphant G, Reynolds AB, Smith PF, Ross PR, Marta JS. 1984b. Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biol Reprod* 31:165-174.

Paquette Y, Merlen Y, Bleau G. 1995. Allelic polymorphism in the hamster oviductin gene is due to a variable number of mucin-like tandem repeats. *Mol Reprod Dev* 42:388-396.

Pimental RA, Julian J, Gendler SJ, Carson DD. 1996. Synthesis and intracellular trafficking of Muc-1 and mucins by polarized mouse uterine epithelial cells. *J Biol Chem* 271:28128-28137.

Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Sela-Buurlage MB, van den Elzen PJM, Melchers LS, Cornelissen BJC. 1994. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol* 104:109-118.



Porchet N, Buisine M-P, Desseyn J-L, Moniaux N, Nollet S, Degand P, Pigny P, Van Seuning I, Laine A, Aubert J-P. 1999. Gènes MUC: une superfamille de gènes? Vers une classification fonctionnelle des apomucines humaines. *J Soc Biol* 193:85-99.

Rabenstein MD, Zhou S, Lis JT, Tjian R. 1999. TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4791-4796.

Reeder RL, Shirley B. 1999. Deciliation in the ampulla of the rat oviduct and effects of estrogen in the process. *J Exp Zool* 283:71-80.

Rehli M, Krause SW, Andreesen R. 1997. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* 43:221-225.

Rejman JJ, Hurley WL. 1988. Isolation and characterization of a novel 39 kilodalton whey protein from bovine mammary secretions collected during the nonlactating period. *Biochem Biophys Res Commun* 150:329-334.

Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JMFG. 1995. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem* 270:2198-2202.

Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, Hrebicek M, Aerts JMFG. 1998. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 251:504-509.

Reuter LM, O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG. 1994. In vitro incubation of golden (syrian) hamster ovarian oocyte and human sperm with a human oviduct specific glycoprotein. *Mol Reprod Dev* 38:160-169.

Rexroad Jr CE, Powell AM. 1988. Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 29:387-397.

Robitaille G, St-Jacques S, Potier M, Bleau G. 1988. Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol Reprod* 38:687-694.

Roux E, Kan FWK. 1995. Stage-specific immunolabeling for oviductin in the secretory granules of the oviductal epithelium of the golden hamster during the estrous cycle. *Anat Rec* 241:369-376.

Sacco AG, Shivers CA. 1973. Antigens of the rabbit ovary, oviduct and uterus. *J Reprod Fert* 32:403-414.

Saito A, Ozaki K, Fujiwara T, Nakamura Y, Tanigami A. 1999. Isolation and mapping of a human lung-specific gene, TSA1902, encoding a novel chitinase family member. *Gene* 239:325-331.

Sakai Y, Araki Y, Yamashita T, Kurata S, Oikawa T, Hiroi M, Sendo F. 1988. Inhibition of in vitro fertilization by a monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. *J Reprod Immunol* 14:177-189.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. "Molecular cloning, a laboratory manual", 2<sup>ème</sup> édition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.

Schmidt A, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman, Jaffe RC, Verhage HG. 1997a. Characterization of antibodies generated against a conserved portion of oviductal glycoprotein (OGP) and endogenous hamster OGP and their ability to decrease sperm binding to the zona pellucida in vitro. *Am J Reprod Immunol* 38:377-383.

Schmidt A, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman, Verhage HG. 1997b. Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Mol Reprod Dev* 46:201-207.

Semino CE, Specht CA Raimondi A, Robbins PW. 1996. Homologs of the *Xenopus* developmental gene *DG42* are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4548-4553.

Sendai Y, Abe H, Kikuchi M, Satoh T, Hoshi H 1994. Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 50:927-934.

Sendai Y, Komiya H, Suzuki K, Onuma T, Kikuchi M, Hoshi H, Araki, Y. 1995. Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 53:285-294.

Shackelton LM, Mann DM, Millis AJT. 1995. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J Biol Chem* 270:13076-13083.

Shankar V, Pichan P, Eddy RL, Tonk V, Nowak N, Sait SNJ, Shows TB, Schultz RE, Gotway G, Elkins RC, Gilmore MS, Sachdev GP. 1997. Chromosomal localization of a human mucin gene (*MUC8*) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:232-241.

Shapiro SS, Jentsch JP, Yard AS. 1971. Protein composition of oviducal fluid. *J Reprod Fert* 24:403-408.

Shapiro SS, Brown NE, Yard AS. 1974. Isolation of an acidic glycoprotein from rabbit oviducal fluid and its association with the egg coating. *J Reprod Fert* 40:281-290.

St-Jacques S, Bleau G. 1988. Monoclonal antibodies specific for an oviductal component associated with the hamster zona pellucida. *J Reprod Immunol* 12:247-261.

St-Jacques S, Malette B, Chevalier S, Roberts KD, Bleau G. 1992. The zona pellucida binds the mature form of an oviductal glycoprotein (oviductin). *J Exp Zool* 262:97-104.

Stone SL, Hamner CE. 1975. Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol Invest* 6:234-252.

Strous GJ, Dekker J. 1992. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27:57-92.

Sun T, Lei ZM, Rao CV. 1997. A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 131:97-108.

Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton S, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD. 1995. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology* 136:3639-3647.

Sutton R, Nancarrow CD, Wallace ALC, Rigby NW. 1984a. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *J Reprod Fert* 72:415-422.

Sutton R, Wallace ALC, Engel H, Nancarrow CD. 1984b. Binding of sheep oviducal fluid proteins to spermatozoa. In: DR Lindsay and DT Pearce, éditeurs. "Reproduction in sheep." Canberra: Australian Academy of Science, pp. 140-143.

Suzuki K, Sendai Y, Onuma T, Hoshi H, Hiroi M, Araki Y. 1995. Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 53:345-354.

Takahashi K, Sendai Y, Matsuda Y, Hoshi H, Hiroi M, Araki Y. 2000. Mouse oviduct-specific glycoprotein gene: genomic organization and structure of the 5' flanking regulatory region. *Biol Reprod* 62:217-226.

Thomas TS, Ross P, Taylor RP. 1991. Complement biology in the rabbit oviduct and complement inhibition by sulfated oviductal glycoprotein. *Arch Biol Med Exp* 24:317-329.

Tulsiani DRP, Yoshida-Komiya H, Araki Y. 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate mediated event. *Biol Reprod* 57:487-494.

Van Klinken BJ-W, Dekker J, Büller HA, Einerhand AW. 1995. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol* 269:G613-G617.

Vansteenbrugge A, Van Langendonck A, Massip A, Dessip F. 1997. Effect of estrus-associated glycoprotein and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 secreted by oviduct cells on in vitro bovine embryo development. *Mol Reprod Dev* 46:527-534.

Varki A. 1996. Does DG42 synthesize hyaluronan or chitin?: A controversy about oligosaccharides in vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4523-4525.

Velker J. 1997. In: Velker J, éditeur. *Clemente Anatomy*, 4<sup>th</sup> Edition. Baltimore. p. 263.

Verhage HG, Fazleabas AT. 1988. The in vitro synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*Papio anubis*) oviduct. *Endocrinology* 123:552-558.

Verhage HG, Fazleabas AT, Donnelly K. 1988. The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* 122:1639-1645.

Verhage HG, Boice ML, Mavrogianis P, Donnelly K, Fazleabas AT. 1989. Immunological characterization and immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the baboon (*Papio anubis*). *Endocrinology* 124:2464-2472.

Verhage HG, Mavrogianis PA, Boice ML, Li W, Fazleabas AT. 1990. Oviductal epithelium of the baboon: hormonal control and the immunogold localization of oviduct-specific glycoproteins. *Am J Anat* 187:81-90.

Verhage HG, Mavrogianis PA, Boomsma RA, Schmidt A, Brenner RM, Slayden OV, Jaffe RC. 1997. Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biol Reprod* 57:525-531.

Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, Fujii T, Sakai H, Uchida M, Tanaka H. 1993. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J Biol Chem* 268:18567-18572.

Wegner CC, Killian GJ. 1992. Origin of œstrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid. *J Reprod Fert* 95:841-854.

Yang C-H, Yanagimachi Y. 1989. Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster. *Hum Reprod* 4:63-71.

Yoshizaki N, Katagiri CH. 1981. Oviducal contribution to alteration of the vitelline coat in the frog, *Rana japonica*. An electron microscopic study. *Develop Growth Differ* 23:495-506.



## 8. Annexes

VOIR PAGES SUIVANTES

## 8.1 amorces utilisées dans ce travail

| Oligo. | Séquence |     |      | Orientation | Position | Appariement |     |     |     |      |     |     |     |           |                 |                 |
|--------|----------|-----|------|-------------|----------|-------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----------|-----------------|-----------------|
| MCO    | CCT      | CTT | CGC  | TAT         | TAC      | GCC         | AGA | CTG | TGA | GGC  | TGA | CAA | TCC | TAC       | -               | oligo. AC2J     |
| AC2J   | TAG      | GAT | TGT  | CAG         | CCT      | CT          |     |     |     |      |     |     |     |           | -               | oligo. MCO      |
| T3L    | GCC      | CGC | GAA  | TTA         | ACC      | CTC         | ACT | AAA | GGG | AAC  |     |     |     |           | -               | bacteriophage λ |
| CP1    | CCT      | CTT | CGC  | TAT         | TAC      | GCC         | AGA | CTG | TG  |      |     |     |     |           | -               | oligo. MCO      |
| G6S    | TAT      | GTA | TGC  | AGA         | ATC      | AGA         | GTT | GCC | AGG | TTTT |     |     |     |           | -1953/-1982     | 5' flanquant    |
| G7S    | AGT      | CAC | AGA  | AGT         | AGA      | GGT         | CAA | CAT | TTC | ATA  |     |     |     |           | -1761/-1732     | 5' flanquant    |
| G8S    | ATT      | AGA | GTC  | GAA         | CAT      | CGG         | GAG | TCG | TTT |      |     |     |     |           | -1566/-1540     | 5' flanquant    |
| G8A    | TTA      | TGT | GAT  | GAA         | CITA     | AGC         | AAG | AAA | CTC | A    |     |     |     |           | -1278/-1305     | 5' flanquant    |
| G7A    | AGT      | CTG | TAC  | ATC         | AGC      | TGT         | TGC | TTT | AAT | CCA  |     |     |     |           | -1111/-1140     | 5' flanquant    |
| G6A    | GAT      | TGG | TAA  | AGT         | AGG      | GGA         | TAG | TAC | ACT | TGA  |     |     |     |           | -832/-861       | 5' flanquant    |
| G5A    | GAA      | TAT | ACA  | GGA         | ACT      | GAA         | GAG | ATA | GTG | TGA  |     |     |     |           | -522/-551       | 5' flanquant    |
| G4A    | CAC      | AGC | TGA  | GGT         | GGA      | GGA         | GAA | ACA | CTG | AA   |     |     |     |           | -284/-312       | 5' flanquant    |
| G0S    | GCC      | AAT | TGC  | CAG         | ACA      | AGG         | CTC | AGG | AAC | ACT  |     |     |     |           | -259/-230       | 5' flanquant    |
| ERES   | TTT      | CTG | AGG  | TCA         | CTG      | TGA         | CIT | GTT | TCT | GGC  |     |     |     |           | -114/-85        | 5' flanquant    |
| EREA   | GCC      | AGA | AAC  | AAG         | TCA      | CAG         | TGA | CCT | CAG | AAA  |     |     |     |           | -85/-114        | 5' flanquant    |
| G2Ac   | GCC      | AGA | AAC  | AAG         | TCA      | CAG         | TGA | CCT | CAG | AAA  | TAC | TCC | TAC |           | -94/-123        | 5' flanquant    |
| G1A0   | CAA      | CCC | ACA  | GCA         | GCA      | GCC         | TCC |     |     |      |     |     |     | 39/19     | exon 1          |                 |
| G1S    | TGC      | CAC | ACA  | GTT         | CAG      | GAG         | AT  |     |     |      |     |     |     | 63/82     | intron 1        |                 |
| EXAA   | TGA      | AAG | CAG  | CITA        | GGT      | TGG         | AGA | ACT | GCT | GCC  |     |     |     | 225/196   | intron 1        |                 |
| G2S    | TTG      | TCC | CITA | TGC         | AAA      | GCA         | AGA |     |     |      |     |     |     | 352/372   | intron 1        |                 |
| G2Ab   | ACC      | TGC | TCA  | TGC         | TTT      | GCA         | TAG | GGA | CAA | TGA  |     |     |     | 378/349   | intron 1        |                 |
| G2A    | GTA      | GGT | GGT  | TTC         | CTT      | ACC         | GT  |     |     |      |     |     |     | 626/607   | intron 2/exon 1 |                 |
| G1A    | GAG      | CAA | GCC  | ACT         | GTA      | ACA         | GA  |     |     |      |     |     |     | 908/889   | intron 2        |                 |
| 4SL    | TAC      | AAG | CTG  | GTC         | TGC      | TAT         | TTC | ACC | AAC | TGG  |     |     |     | 1005/1034 | exon 3          |                 |
| 7BAL   | GTG      | TGT | ACA  | AAG         | AAA      | GGG         | ATC | CAG | GTC | A    |     |     |     | 1100/1073 | exon 3          |                 |
| 7AL    | GGC      | AAA | GGC  | AAA         | TAT      | CAG         | GTG | TGT | ACA | AAG  | AAA | G   |     | 1118/1089 | exon 3          |                 |
| 7SG2   | CAC      | TTT | TTA  | AGA         | GCT      | CTC         | CAT | CGA | CCA | GCC  |     |     |     | 1347/1376 | intron 3        |                 |
| 8SG0   | CCA      | CTT | TCT  | CCC         | CCA      | CAT         | TCC | AGG | AAC | AGA  |     |     |     | 1856/1885 | intron 3/exon 4 |                 |
| 8SG1   | GCT      | GGC | TGT  | GTT         | AGA      | GAT         | AAA | GAC | ACA | ACT  |     |     |     | 2599/2628 | intron 4        |                 |
| 8AG1   | AAC      | CTC | GGG  | ACC         | GTC      | TTC         | TGG | ACT | GTC | AG   |     |     |     | 2814/2786 | intron 4        |                 |
| 8SL    | CTT      | CCT | GAG  | AAC         | ACA      | TGG         | CTT | TGA | TGG | GCT  |     |     |     | 3485/3514 | exon 5          |                 |
| 8AL    | TCG      | TAG | TCC  | AGG         | GTA      | CAA         | GAA | GAA | GAG |      |     |     |     | 3545/3519 | exon 5          |                 |

| Oligo. | Séquence                                          |  | Orientation | Position     | Appariement     |
|--------|---------------------------------------------------|--|-------------|--------------|-----------------|
| 9SL0   | ACT GCT CAC CCA GCG CCC GAG GCT GCT G             |  | sens        | 3996/4023    | exon 6          |
| 9AL0   | AAG GTG CAC ATC ATA AGA TGT TTG AAT GAT GTA       |  | antisens    | 4083/4051    | exon 6          |
| 10AG1  | GGC AGT GTC TCA TTA TAC AAC CCA TAC TGA CCT A     |  | antisens    | 4948/4915    | intron 6        |
| 10SG1  | CAC AGG AGG CTC TGA TGG TCA ACT TGC AGC           |  | sens        | 5327/5356    | intron 6        |
| 10AL0  | C TT TTC CCA ACT TTC ATG TAA GTC ATA AG           |  | antisens    | 5494/5465    | exon 7          |
| 10SL2  | CAG AGA ATC CAA GAA TGG ATT GCA GGC TGC CTC A     |  | sens        | 5726/5759    | exon 8          |
| 5AL0   | CAT CTA AGT CAT TCT TTG TGA GGT TGT TGC           |  | antisens    | 6795/6766    | intron 8        |
| 5SL0   | AGG TTTT GTT CCT TTA TCC AGA GAG CAG AA           |  | sens        | 7356/7384    | intron 8/exon 9 |
| 5SL    | GGA AGG AGT GGG TTG GCT ATG ATG CCG TCA GC        |  | sens        | 7428/7462    | exon 9          |
| 5AL    | GCT GAC GGC ATC ATC ATA GCC AAC CCA CTC CTT CC    |  | antisens    | 7462/7428    | exon 9          |
| 5SG1   | GTA AGT GGC ATA AAT AAA GTT GAC TCT GAC AG        |  | sens        | 7874/7905    | intron 9        |
| 5SG2   | TGT TCT TTG GGA GAC AGT TTG GGG AAA               |  | sens        | 8607/8633    | intron 9        |
| 5SG3   | GTC ACA GTG CCT TAA AGT                           |  | sens        | 9337/9354    | intron 9        |
| 5AG2   | CAG CTC TAA CTA AAC CAC AGG GCT TGC AC            |  | antisens    | 10269/10241  | intron 9        |
| 5AG1   | TAA TGG TAT GAA AGT CAA ACA ACA T                 |  | antisens    | 10960/10936  | intron 9        |
| 6S     | GCC ATG GTG TGG ACA CTG GA                        |  | sens        | 11461/11480  | exon 10         |
| 6AL    | CCT GAC GTC ATC CAT ATC CAG TGT CCA CAC           |  | antisens    | 11496/11467  | exon 10         |
| 6AL2   | CTG CCC GCA CCA AGA GCT CAT TCA ATA TAT GGA C     |  | antisens    | 11563/11530  | exon 10         |
| 6SG    | TTG ACA CTG ACG CAG ACT TTA ATG TCA ACC           |  | sens        | 11652/11681  | intron 10       |
| 6SG2   | TGT TGA TAT TAG TGG CTG TAC TGG CAG TTA           |  | sens        | 11896/11925  | intron 10       |
| 6SG3   | AAT TAG ACC TTG AAC AAT GTC TGT CTA               |  | sens        | 12092/12118  | intron 10       |
| 11AL3  | CAC CAA AGC TCT GTA ACC TTA CCC ATA GGT G         |  | antisens    | 12267/12237  | intron 10       |
| 11AL2  | CTC AGA GCC AGG TCC TGA GGA ATT CAC AGG           |  | antisens    | 12511/12482  | exon 11         |
| 11AL1  | CAG TAT CAG TGG TCA ACT CTT CTG TCG CGG GAA GAC T |  | antisens    | 12548/12512  | exon 11         |
| 12SL   | AGG AGG AGA GGC TAT GGC CAC TGA GGT CC            |  | sens        | 12565/12593  | exon 11         |
| 11AL   | GGA CCT CAG TGG CCA TAG CCT CTC CTC CTG           |  | antisens    | 12593/12565  | exon 11         |
| 12AL   | TCC TGG GAA TAA CTT TCC ACC TCA GCA ATC           |  | antisens    | 13248/113219 | exon 11         |
| 13A    | CTC ATG CTT CCA ATT TAT TCG ACA GAA AGG           |  | antisens    | 13623/13594  | exon 11         |

## 8.2 conditions des principales amplifications par PCR

| Utilisation                                                     | Etape                   | T (°C)              | Durée (s)       | # Cycles | Sens                | Anti.              | Produit                          |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|----------|---------------------|--------------------|----------------------------------|
| isolement d'une partie de l'ADNc de l'oviductine de hamster     | dénaturation initiale   | 94                  | 180             |          | OV2S                | OV4A               | OV2S-OV4A                        |
|                                                                 | dénaturation            | 94                  | 60              |          |                     |                    |                                  |
|                                                                 | appariement<br>synthese | 45<br>72            | 120<br>240      | 30       |                     |                    |                                  |
| vérification du polymorphisme de l'oviductine de hamster        | dénaturation initiale   | 94                  | 180             |          | 12S                 | 12A                | 12S-12A                          |
|                                                                 | dénaturation            | 94                  | 60              |          |                     |                    |                                  |
|                                                                 | appariement<br>synthese | 45<br>72            | 300<br>72       | 30       |                     |                    |                                  |
| isolement de la partie 5' NT du gène de l'oviductine de hamster | dénaturation initiale   | 92                  | 60              |          | CP1                 | 7AL                | Avril                            |
|                                                                 | dénaturation            | 92                  | 10              |          |                     |                    |                                  |
|                                                                 | appariement<br>synthese | 72 - 1°/cycle<br>68 | 30<br>480       | 20       |                     |                    |                                  |
| isolement de la partie 5' NT du gène de l'oviductine de hamster | dénaturation            | 92                  | 10              |          |                     |                    |                                  |
|                                                                 | appariement             | 50                  | 30              | 20       |                     |                    |                                  |
|                                                                 | synthese                | 68                  | 480 + 20s/cycle |          |                     |                    |                                  |
| isolement de la partie 5' NT du gène de l'oviductine de hamster | dénaturation initiale   | 94                  | 180             |          | T3L                 | G2A                | B8                               |
|                                                                 | dénaturation            | 94                  | 60              |          |                     |                    |                                  |
|                                                                 | appariement<br>synthese | 50<br>68            | 60<br>180       | 40       |                     |                    |                                  |
| isolement du gène de l'oviductine de hamster                    | dénaturation initiale   | 95                  | 180             |          | 4SL                 | 8AL                | 4SL-8AL                          |
|                                                                 | dénaturation            | 95                  | 90              |          | 8SL                 | 10AL0              | 8SL-10AL0                        |
|                                                                 | appariement<br>synthese | 60<br>68            | 60<br>300       | 30       | 9SL0<br>10SL2<br>6S | 10AL<br>5AL<br>13A | 9SL0-10AL<br>10SL2-5AL<br>6S-13A |
| isolement du gène de l'oviductine de hamster                    | dénaturation initiale   | 95                  | 180             |          | 5SL0                | 6AL2               | 5SL0-6AL2                        |
|                                                                 | dénaturation            | 95                  | 90              |          |                     |                    |                                  |
|                                                                 | appariement<br>synthese | 60<br>68            | 60<br>600       | 30       |                     |                    |                                  |

Résumé des conditions de PCR utilisées pour l'obtention des principaux produits. Notez que, pour toutes les amplifications, les amorces sont ajoutées à haute température ("hotstart") suivant la dénaturation initiale, qui est exclue du tableau par soucis de concision. Le nombre de cycles fait allusion au nombre de fois que la boucle dénaturation-appariement-synthese a été accomplie pour chacune des conditions. Le produit Avr II a donc suivi 2 boucles de 20 cycles dans les conditions décrites. Les colonnes "Sens" et "Anti." font allusion aux amorces utilisées.