

2m11.2700.4

Université de Montréal

Fonction biologique de l'oviductine de hamster par l'étude d'une oviductine
recombinante partielle sur le développement embryonnaire.

par

Chantale Boisvert

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

Décembre, 1998

©Chantale Boisvert, 1998



4 2020.11.10

Université de Montréal

W

4

U58

1999

V.063

Fonction biologique de l'ovulation de l'ovaire chez l'ovine
reconnaitre par le développement anormal

Christine Boivin
Département de zootechnie
École de zootechnie

Je soussigné, titulaire de ce diplôme, certifie que
ce document a été rédigé par le candidat mentionné
dans le tableau ci-dessous.

Montréal, 1999

Christine Boivin



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Fonction biologique de l'oviductine de hamster par l'étude d'une oviductine
recombinante partielle sur le développement embryonnaire.

présenté par:

Chantale Boisvert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Luc DesGroseillers Ph.D

Gilles Bleau Ph.D

Guy Boileau Ph.D

Mémoire accepté le:

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU	vii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	viii
REMERCIEMENTS	x
SOMMAIRE	xi
1. INTRODUCTION	1
1.1 L'oviducte	1
1.1.1 Anatomie	1
1.1.2 Physiologie	2
1.1.3 La capacitation des spermatozoïdes	2
1.1.4 Le développement embryonnaire	3
1.1.5 Les sécrétions tubaires	4
1.2 Les oviductines	5
1.2.1 Historique	5
1.2.2 Localisation dans l'ovocyte/embryon	5
1.2.3 Diversité et conservation de l'oviductine parmi les espèces	6
1.2.4 Régulation hormonale	9
1.3 L'oviductine de hamster	9
1.3.1 Régulation hormonale	9
1.3.2 Caractéristiques biochimiques et moléculaires	10

1.4 Les rôles possibles de l'oviductine	12
1.4.1 Effet sur la réaction acrosomique, l'interaction des gamètes et la fécondation	12
1.4.2 Effet sur le développement embryonnaire	13
2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	13
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	16
3.1 L'expression de la partie mucine de l'oviductine de hamster	16
3.1.1 Clonage de l'ADNc de la partie mucine de l'oviductine de hamster	16
3.1.2 Production de rhaOvim	18
3.1.3 Purification et renaturation de la rhaOvim	18
3.1.4 Détermination de la concentration protéique et microséquençage	19
3.2 La production d'anticorps anti-rhaOvim	19
3.2.1 Préparation de l'immunogène et immunisation	19
3.2.2 Détermination du titre d'anticorps par immunodétection sur transferts de type Western et par ELISA	20
3.2.2.1 Immunodétection sur transferts de type Western ..	20
3.2.2.2 ELISA	21
3.2.3 Purification des anticorps polyclonaux par chromatographie d'affinité sur protéine A	22
3.2.4 Purification des anticorps polyclonaux par affinité	22

3.3	La spécificité des anticorps polyclonaux anti-rhaOvim	23
3.3.1	Purification d'oviductine purifiée sur agarose couplé à des agglutinines d' <i>Helix Pomatia</i>	23
3.3.2	Immunodétection sur transferts de type Western de rhaOvim et du DHFR recombinants	23
3.3.3	Immunodétection sur transferts de type Western des homogénats d'ovaires et d'utérus	24
3.3.4	Immunocytochimie sur coupes d'oviducte	25
3.3.5	Immunofluorescence indirecte sur des embryons 8-cellules	26
3.4	Le développement embryonnaire	26
3.4.1	Cueillette des ovocytes, fécondation <i>in vitro</i> et développement embryonnaire bovin	26
3.4.2	Augmentation de la solubilité de rhaOvim	28
3.4.3	Test de solubilité	28
4.	RÉSULTATS	30
4.1	La production de l'oviductine recombinante partielle de hamster	30
4.1.1	Expression de rhaOvim	30
4.1.2	Purification et renaturation de rhaOvim	32
4.2	Les anticorps polyclonaux anti-rhaOvim	34
4.2.1	Production et purification d'anticorps polyclonaux dirigés contre rhaOvim	34

4.3 La spécificité des anticorps polyclonaux purifiés	38
4.3.1 Immunoréactivité avec rhaOvim	38
4.3.3 Immunodétection de rhaOvim en présence de DHFR recombinant	41
4.3.3 Immunodétection d'oviductine sur coupes d'oviducte	43
4.3.4 Immunodétection d'oviductine sur des embryons 8-cellules . .	46
4.4 Le développement embryonnaire bovin	49
4.4.1 Effet de rhaOvim sur le développement embryonnaire bovin .	49
4.4.2 Augmentation de la solubilité de rhaOvim	51
5. DISCUSSION	55
6. CONCLUSION	65
7. BIBLIOGRAPHIE	66

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Fig. 1. Similarité des séquences d'oviductines de mammifères et de membres de la famille des chitinases.	8
Fig. 2. Expression de rhaOvim par <i>E. coli</i>	17
Fig. 3. Analyse de l'expression de rhaOvim par <i>E. coli</i>	31
Fig. 4. Analyse de rhaOvim après purification par chromatographie d'affinité.	33
Fig. 5. Détermination du titre d'anticorps par immunodétection sur transferts de type Western.	35
Fig. 6. Détermination du titre d'anticorps par ELISA.	36
Fig. 7. Immunodétection sur transferts de type Western de rhaOvim par les anticorps polyclonaux anti-rhaOvim purifiés par chromatographie sur protéine A et par affinité.	37
Fig. 8. Immunodétection sur transferts de type Western de rhaOvim et de l'oviductine mature purifiée sur agarose couplé à des agglutinines d' <i>Helix Pomatia</i> à l'aide des anticorps polyclonaux anti-rhaOvim et l'anticorps monoclonal 4.12.	39
Fig. 9. Analyse de la spécificité des anticorps anti-rhaOvim.	40
Fig. 10. Immunodétection de rhaOvim et DHFR recombinants par les anticorps polyclonaux purifiés	42
Fig. 11: Immunodétection de l'oviductine sur coupes d'oviductes par immunocytochimie.	44-45
Fig. 12: Immunodétection de l'oviductine par immunofluorescence indirecte sur des embryons 8-cellules.	47-48
Fig. 13: Schéma de purification de rhaOvim et rhaOvim*.	52
Fig. 14. Solubilité de rhaOvim et rhaOvim* selon deux protocoles de purification-renaturation.	53-54
Tableau I: Effet d'une oviductine recombinante partielle de hamster (rhaOvim) sur le développement embryonnaire bovin.	50

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

a.a.:	acide aminé
AcM:	anticorps monoclonal
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
α :	alpha
β :	beta
BSA :	“ <i>bovine serum albumin</i> ”
coll.:	collaborateurs
DHFR:	dihydrofolate réductase
<i>E.coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	éthylènediaminetétraacétate
g:	gravité
GalNAc:	N-acétyl- α -D-galactosamine
h:	heure
haOvim:	ADNc d'oviductine de hamster (région mucine)
HECM-2 :	“ <i>hamster embryo culture medium-2</i> ”
HPA:	lectine de <i>Helix Pomatia</i>
HRP:	“ <i>Horseradish Peroxidase</i> ”
IPTG:	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
kDa:	kilodalton
Mr:	masse relative
μ g:	microgramme
μ L:	microlitre
M:	molaire
min:	minutes
mL:	millilitre

mM:	millimolaire
N-lié:	lié à l'asparagine
Nt:	nucléotide
O-lié:	lié aux résidus sérine ou thréonine
Pb:	paire de base
PBS:	“ <i>phosphate buffered saline</i> ”
PMSF:	“ <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ”
PVDF:	“ <i>poly(vinylidene) difluoride</i> ”
rhaOvim:	oviductine recombinante de hamster (région mucine)
rhaOvim* :	oviductine recombinante de hamster (région mucine) caractérisée par une solubilité accrue
SDS:	sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
solubilité :	propriété des protéines recombinantes à passer au travers d'une membrane de 0,22 μm
TBS :	“ <i>tris buffered saline</i> ”
v/v:	volume pour volume
w/v:	poids pour volume
zp:	zone pellucide
%:	pourcentage
°C:	degré Celcius

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement mon directeur de recherche Dr. Gilles Bleau pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ces années. Merci d'avoir dirigé ma formation de deuxième cycle, m'avoir permis d'acquérir une autonomie scientifique et développer un goût pour la recherche.

J'aimerais également remercier le Dr. Daniel Bousquet ainsi que le Dr. Frederick W.K. Kan pour leur collaboration à mon projet de maîtrise. Merci d'avoir mis votre confiance en moi et d'avoir si ardemment cru en mon projet.

Je tiens aussi à souligner la bonne humeur quotidienne de mes compagnons de laboratoire Yannick Merlen, Frédéric Massicotte et Pascal Amireault. Merci pour tous les services rendus!

Un gros merci à mon compagnon, Louis, qui m'a encouragé tout au long de ce projet. Merci pour ta présence et ton support moral.

Finalement, je dédie ce mémoire à mes parents. Merci beaucoup pour votre confiance, votre support continu et surtout pour votre amour inconditionnel.

SOMMAIRE

L'oviducte est l'organe où s'effectuent la fécondation et le développement précoce de l'embryon. La découverte d'une protéine sécrétée spécifiquement par les cellules sécrétrices de l'oviducte est venue confirmer que cet organe ne jouait pas un simple rôle passif dans les processus de la reproduction. Cependant de nombreuses années de recherche n'ont pas réussi à éclaircir le rôle précis de l'oviductine au niveau de l'oviducte. L'oviductine sécrétée a la propriété de se lier à la couche acellulaire entourant l'ovocyte, la zone pellucide. Elle y reste associée après la fécondation et elle est même, chez le hamster, internalisée par l'embryon à compter du stade 2-cellules. L'embryon continue d'internaliser l'oviductine tout au long de son transit tubaire jusqu'au moment de l'implantation dans l'utérus, stade où la protéine devient complètement absente.

Dans notre proposition d'une hypothèse de travail quant au rôle biologique de l'oviductine, nous nous basons sur trois faits précis. Premièrement, il a été démontré qu'un embryon retenu expérimentalement dans l'oviducte ne dépasse jamais le stade blastocyste, même après transfert utérin. Il existerait donc une substance d'origine tubaire capable de ralentir le développement de l'embryon. Deuxièmement, nous avons observé l'internalisation de l'oviductine par l'embryon à compter du stade 2-cellules et se poursuivant tout au long du transit tubaire. Troisièmement, des études effectuées à l'aide d'un peptide synthétique (P-563) de 20 acides aminés localisés dans la partie N-terminale de l'oviductine ont démontré une inhibition du développement embryonnaire. Nous proposons donc que l'oviductine internalisée serait cet agent inhibiteur du développement embryonnaire. Cet effet aurait pour conséquence d'empêcher l'embryon d'atteindre son stade implantatoire alors qu'il séjourne dans l'oviducte. En d'autres termes, l'oviductine préviendrait les grossesses ectopiques.

L'embryon localisé au niveau utérin pourrait poursuivre son développement puisque l'oviductine est à ce moment complètement absente et atteindre le stade où il est prêt à s'implanter dans l'endomètre.

Afin de vérifier son effet, nous devons disposer d'une quantité appréciable d'oviductine; nous avons donc opté pour la production d'une oviductine partielle recombinante de hamster (rhaOvi_m) dans un système bactérien qui permet d'obtenir une protéine non-glycosylée. Comme l'oviductine internalisée se retrouve dans la voie de dégradation endocytiq-ue-lysosomale, sa structure glycosidique doit être affectée par les glycosidases présentes. Nous croyons que la séquence protéique de l'oviductine, une fois révélée suite au métabolisme par l'embryon, serait la structure active qui permettra d'obtenir l'effet inhibiteur proposé. L'activité inhibitrice de cette protéine recombinante fut par la suite testée sur le développement embryonnaire bovin. Nous avons observé un effet inhibiteur sur le développement embryonnaire bovin à un stade tardif du développement tubaire c'est-à-dire au stade blastocyste. L'oviductine serait donc cet agent inhibiteur du développement embryonnaire qui empêche le développement tubaire trop rapide de l'embryon. Des anticorps polyclonaux furent également produits en utilisant la rhaOvi_m comme immunogène. Les anticorps purifiés reconnaissent la rhaOvi_m, l'oviductine à l'intérieur des granules de sécrétion de l'épithélium tubaire ainsi que l'oviductine liée à la zone pellucide de l'embryon. Ces anticorps, reconnaissant un épitope protéique, serviront d'outils afin d'étudier le métabolisme de l'oviductine par l'embryon.

1. INTRODUCTION

1.1 L'oviducte

1.1.1 Anatomie

L'oviducte est l'organe où se produisent la maturation finale des gamètes, la fécondation et le développement embryonnaire précoce. Sa paroi est constituée principalement d'un revêtement séreux, d'une couche musculaire et d'une muqueuse interne. La couche musculaire comprend des couches de muscles lisses, circulaires et longitudinales. La muqueuse interne forme de nombreux replis qui se prolongent dans la lumière de l'oviducte et son épithélium est composé de cellules cylindriques simples.

Deux types principaux de cellules sont présents au niveau de l'épithélium de l'oviducte soit les cellules ciliées et les cellules sécrétrices. Les cellules ciliées, par leur battement rythmique, permettent à l'ovocyte et à l'embryon d'être entraînés vers l'utérus (Afzelius et coll., 1978). Les cellules sécrétrices sont intercalées entre les cellules ciliées. Elles sont impliquées dans la formation du fluide tubaire par l'ajout de constituants spécifiques à l'oviducte.

L'oviducte est divisé en cinq régions: le segment intramural, l'isthme, la jonction isthme-ampoule, l'ampoule et l'infundibulum. Le segment intramural représente la zone de transition entre l'oviducte et l'utérus. Cette portion est caractérisée par une augmentation marquée dans le nombre de cellules ciliées et par un changement de forme des cellules sécrétrices (Fadel et coll., 1976).

L'isthme débute à la jonction uterotubaire et représente le segment le plus long de l'oviducte. Cependant le calibre de sa lumière est le plus petit de tous les segments tubaires. Cette partie est caractérisée par un recouvrement musculaire prononcé permettant le transport adéquat des gamètes mâles au site de fécondation ainsi que le déplacement de l'oeuf vers l'utérus.

La jonction ampoule-isthme est caractérisée par un changement de la consistance de la paroi de l'oviducte. Alors que la paroi de l'isthme est épaisse, celle de l'ampoule est plus mince avec une lumière interne supérieure à celle de l'isthme. L'ampoule représente le lieu de rencontre des spermatozoïdes avec l'ovocyte.

L'infundibulum est la partie la plus distale de l'oviducte. Celui-ci permet la captation et le transport des ovocytes ovulés vers l'ampoule.

1.1.2 Physiologie

L'oviducte remplit plusieurs rôles essentiels et cruciaux. En effet, l'oviducte, en plus de constituer le lien anatomique entre l'ovaire et l'utérus, est le site des premières étapes de la vie: la maturation des gamètes, la fécondation et le développement embryonnaire.

1.1.3 La capacitation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes, une fois éjaculés dans le tractus génital femelle, vont subir certaines modifications conduisant à leur maturation finale. Une de ces modifications, la capacitation, permet aux spermatozoïdes d'acquérir leur pouvoir fécondant suite à leur exposition au fluide tubaire (Yanagimachi, 1988). Ce

processus de la capacitation comprend entre autres l'enlèvement de certaines glycoprotéines épидидymaires localisées à la membrane plasmique du spermatozoïde (Aunomas et coll., 1973; Oliphant, 1976; Reddy et coll., 1980), le réarrangement de particules associées à la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde (Saxena et coll., 1986; Hartman et coll., 1971) ainsi qu'une augmentation de la motilité, l'hyperactivité (Yanagimachi, 1994; Suarez, 1996). Faisant partie de la première catégorie, les "decapacitation factors" inhibent rapidement le pouvoir fécondant à la suite de leur addition à des spermatozoïdes non-capacités *in vitro* (Bedford et Chang, 1962). Ces facteurs représenteraient donc un mécanisme afin de prévenir les spermatozoïdes de devenir fertiles trop rapidement (Fraser, 1990).

À l'inverse, un peptide permettrait de promouvoir l'acquisition du pouvoir fécondant. En effet, le "Fertilizing Promoting Peptide (FPP)", ajouté à une suspension de spermatozoïdes humains et de souris *in vitro*, permet la capacitation ainsi que l'acquisition du pouvoir fécondant (Green et coll., 1994, 1996b). Ce peptide serait également responsable de l'hyperactivité des spermatozoïdes de souris par l'augmentation de leur motilité (Green et coll., 1996a). Finalement la capacitation est un prérequis à la réaction d'acrosome. Le spermatozoïde ayant subi sa réaction acrosomique aura la capacité de pénétrer la zp. En effet, la réaction acrosomique est induite à la suite du contact du spermatozoïde avec la surface de la zp, ce qui constitue l'étape préliminaire à la pénétration du spermatozoïde.

1.1.4 Le développement embryonnaire

Plusieurs indices nous laissent croire que le fluide tubaire exercerait un rôle fonctionnel. En effet, plusieurs études ont démontré une augmentation du nombre

d'embryons s'étant développés lorsque ceux-ci sont incubés en présence de différentes composantes de l'oviducte. Ménézou et coll. (1989) démontrèrent que le pourcentage d'embryons mature est augmenté par co-incubation de jeunes embryons avec des oviductes isolés. Carney et coll. (1990) et Broerman et coll. (1989) confirmèrent ce résultat en utilisant des cellules tubaires de l'oviducte et un milieu conditionné par l'oviducte respectivement.

1.1.5 Les sécrétions tubaires

Le fluide tubaire sécrété par l'oviducte constitue le milieu physiologique pour la phase finale de maturation de l'ovocyte, la capacitation, la fécondation et le développement embryonnaire précoce. Il a été démontré que le fluide tubaire est un mélange composé majoritairement de transsudat sanguin et de sécrétions de l'épithélium de l'oviducte. Selon les espèces, il peut également contenir des constituants provenant du liquide folliculaire, péritonéal ou de l'utérus (Hunter, 1988). Les composants protéiques d'origine plasmatique du fluide tubaire sont majoritairement l'albumine et des immunoglobulines (Leese, 1988). Leur localisation dans le fluide tubaire serait due à leur diffusion passive et sélective au travers des cellules épithéliales. Les sécrétions originant des cellules sécrétrices de l'épithélium tubaire constituent la deuxième source majeure protéique du fluide tubaire. Certaines de ces protéines seraient synthétisées de façon constitutive tandis que d'autres seraient davantage synthétisées durant l'oestrus et le diestrus (Gandolfi et coll., 1989). Chez plusieurs espèces, il a été démontré que ces protéines spécifiques à l'oviducte étaient glycosylées (Robitaille et coll., 1988) et que certaines interagissaient avec l'ovocyte.

1.2 Les oviductines

1.2.1 Historique

Fox et Shivers (1975) démontrèrent que des anticorps dirigés contre des extraits protéiques isolés du tractus génital femelle réagissaient avec la zp des ovocytes tubaires mais ne liaient pas la zp des ovocytes ovariens. Leurs résultats suggéraient que la zp était modifiée suite à l'ovulation. Léveillé et coll. (1987) identifièrent l'origine de la composante ajoutée, soit l'oviducte. Plus précisément, cette composante désignée "oviductine" est spécifiquement synthétisée par les cellules sécrétrices de l'oviducte. Cette spécificité tissulaire fut démontrée à maintes reprises, par immunofluorescence (St-Jacques et coll., 1988), immunocytochimie (Kan et coll., 1989) et hybridation *in situ* (DeSouza et coll., 1994). Cependant, il semble exister des différences au niveau de la sécrétion d'oviductine par les différents segments de l'oviducte. Chez la souris (Kapur and Johnson, 1988) et la brebis (Gandolfi et coll., 1991), l'oviductine est détectée au niveau de l'ampoule tandis qu'elle semble être également localisée à l'isthme chez le lapin (Oliphant et coll., 1984) et le babouin (Verhage et coll., 1990).

1.2.2 Localisation dans l'ovocyte/embryon

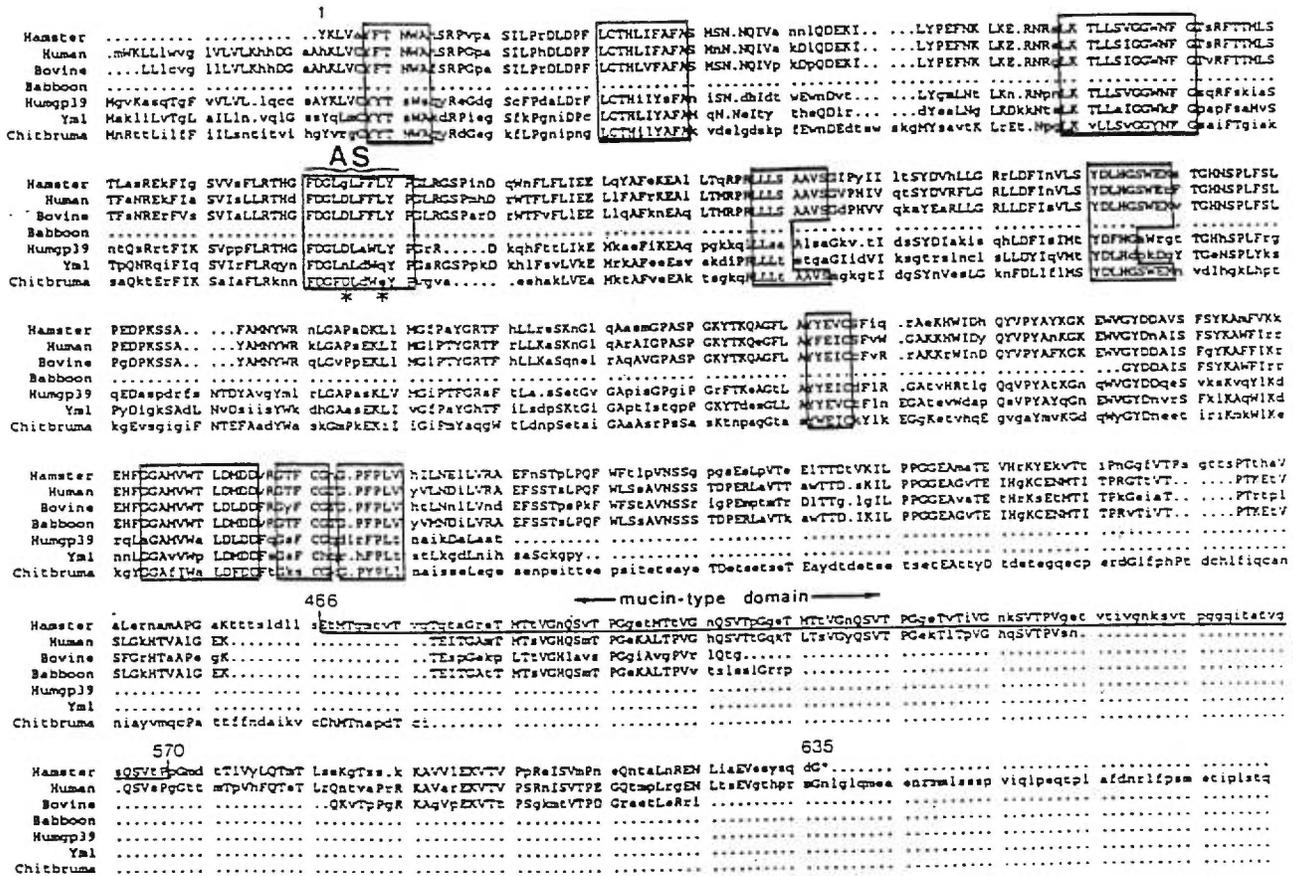
L'oviductine, une fois synthétisée et sécrétée par l'épithélium tubaire a la capacité de s'associer à la zp des ovocytes ovulés. Bien que chez la majorité des mammifères l'oviductine présente une distribution homogène dans la structure de la zp post-ovulatoire, le site précis de l'association de l'oviductine avec l'oeuf diffère

sensiblement selon l'espèce (Kan et coll., 1989; Boice et coll., 1990; Buhi et coll., 1993). En effet, chez le lapin, elle forme une couche relativement épaisse à la périphérie des ovocytes ovulés (Shapiro et coll., 1974) et s'associe spécifiquement avec l'espace périvitellin chez la souris (Kapur et Johnson, 1988). Cette association demeure même à la suite de la fécondation. En utilisant un anticorps monoclonal (AcM 4.12) reconnaissant un épitope glycosidique, Kan et coll. (1993) ont noté par immunocytochimie une internalisation (par endocytose) de l'oviductine par les blastomères d'embryons de hamsters à compter du stade 2-cellules. Elle se localise ensuite dans la voie de dégradation cellulaire, soit la voie lysosomale-endocytique. Au niveau tubaire, l'embryon en développement continue à internaliser l'oviductine, cependant chez l'embryon au stade péri-implantatoire, celle-ci devient complètement absente.

1.2.3 Diversité et conservation de l'oviductine parmi les espèces

Tel que démontré par de nombreux auteurs, l'oviductine est présente chez une grande diversité d'espèces et se caractérise entre autres par une hétérogénéité au niveau de sa masse moléculaire: le lapin, 71 kDa (Shapiro et coll., 1974; Oliphant et coll., 1982); le hamster, 160-240 kDa (Léveillé et coll., 1987; St-Jacques et Bleau, 1988); la souris, 215 kDa (Kapur et Johnson, 1985); le porc, 115 kDa (Buhi et coll., 1994); le bovin, 97 kDa (Malayer et coll., 1988; Boice et coll., 1990); le babouin 100-130 kDa (Verhage et Fazleabas, 1988); la brebis, 90-92 kDa (Sutton et coll., 1986) et l'humain, 120-130 kDa (Verhage et coll., 1988). Il est à noter que cette hétérogénéité au niveau de la masse moléculaire est due principalement à la glycosylation qui diffère d'une espèce à l'autre. L'oviductine est une protéine bien conservée parmi les espèces (Fig. 1). Par exemple, l'oviductine de hamster présente 68% d'identité avec l'oviductine bovine, 59% avec celle du babouin et 71% avec celle de l'humain. Il est

intéressant de noter que de tous les mammifères où l'on a observé la présence d'une oviductine, celle de hamster présente le plus de similitude avec la protéine humaine.



Tiré de "Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific zp-associating glycoproteins."

Malette, B., Paquette, Y., Merlen, Y., Bleau, G. (1995)

Molecular reproduction and development 41, 384-397.

Fig. 1. Similarité des séquences d'oviductines de mammifères et de membres de la famille des chitinasés.

Les résidus Glu et Asp qui sont essentiels à l'activité glycohydrolytique du site actif (AS) des chitinasés sont indiqués par un astérisque (*). Les séquences représentant une homologie avec les chitinasés sont encadrées. La portion mucine contenant les six copies d'une répétition de 15 acides aminés est soulignée. Les pointillées représentent les portions de séquences où il y a absence d'alignement entre résidus identiques.

1.2.4 Régulation hormonale

Une corrélation fut établie entre la période du cycle oestral où la concentration en estradiol est élevée et l'apparition de l'oviductine dans le fluide tubaire. En effet, la synthèse de l'oviductine est sous contrôle hormonal. L'administration d'estrogène à des animaux ovariectomisés restaure la production d'oviductine (Oliphant et coll., 1984; Bui et coll., 1991,1992; Verhage et coll., 1989, 1990). Donnelly et coll. (1991) ont également démontré, par l'hybridation d'un ADNc de babouin, que l'ARNm de l'oviductine est absente chez le babouin, l'humain et le chat lorsque la concentration en progestérone est élevée. Par contre, chez la souris, le hamster et le lapin, la teneur en ARNm pour la protéine est la même chez des animaux en phase périovulatoire (estradiol élevé) qu'en période de gestation/pseudogestation (progestérone élevée). Le contrôle de la synthèse de l'oviductine impliquerait donc moins de variations durant le cycle chez le lapin, le hamster et la souris que chez l'humain, le babouin et le chat où l'expression de l'ARNm de l'oviductine est fortement inhibée par la progestérone.

1.3 L'oviductine de hamster

1.3.1 Régulation hormonale

Chez le hamster (*Mesocricetus auratus*), l'oviductine est présente de façon maximale au temps de l'ovulation. L'ovariectomie diminue le signal d'immunodétection de l'oviductine au niveau de l'épithélium tubaire et l'administration d'estradiol à des femelles prépubaires stimule sa production (Malette et coll., 1995a). L'induction de sa synthèse est donc dépendante de l'estradiol et son

taux de production semble être sous le contrôle de cette hormone. Un taux basal élevé d'oviductine est présent tout au long du cycle, ce qui contraste avec la situation observée chez la brebis où il y a disparition de l'oviductine lors de la phase lutéale. Ceci pourrait être expliqué par une synthèse constitutive de l'oviductine chez le hamster ou par une vitesse de renouvellement ("*rate of turnover*") de l'oviductine plus longue que le cycle lui-même. Précisons également que l'oviductine persiste à un taux basal élevé même durant la gestation (Roux et coll. 1994).

1.3.2 Caractéristiques biochimiques et moléculaires

On connaît plusieurs caractéristiques biochimiques de la protéine. Chez le hamster, elle se présente sous les formes dites α et β . Ces deux formes, de masses moléculaires relatives (M_r) de 160-210 kDa et 210-350 kDa respectivement, possèdent la même séquence protéique N-terminale mais diffèrent par leur degré de glycosylation. En effet, des études de déglycosylation partielle de la forme β avec l'acide trifluorométhanesulfonique (TMSF) permettent d'obtenir une protéine possédant le pI de la forme α (Malette et Bleau, 1993). L'oviductine est fortement O-glycosylée avec en plus sept sites potentiels de N-glycosylation. Seulement 1 ou 2 sites de N-glycosylation seraient utilisés puisque la tunicamycine provoque un changement de seulement 10k Da de la M_r de l'oviductine (Malette et coll. 1995b).

Au niveau moléculaire, l'ADNc de l'oviductine de hamster est composé de 2276 paires de base (pb) (Paquette et coll., 1995). On peut diviser la séquence déduite en acides aminés en deux régions soit, une région similaire à celle des chitinases et une région présentant les caractéristiques des mucines. La portion N-terminale (correspondant aux nt 1-1300) comporte plusieurs séquences similaires

(environ 50% d'identité) à une variété de chitinases de bactéries et de microfilaires. Bien qu'elle ne possède aucune activité chitinase (à cause de la substitution de deux acides aminés dans le site actif), l'oviductine pourrait utiliser certaines composantes structurales reliées aux chitinases pour sa liaison aux carbohydrates. Soulignons que les chitinases clivent la chitin, un polymère de N-acétylglucosamine (GlcNAc). Puisque l'oviductine se lie à la zone pellucide, laquelle contient des résidus GlcNAc, cette liaison pourrait dépendre de la séquence chitinase retrouvée chez l'oviductine.

Quant à la portion C-terminale (nt 1300-2276), elle présente les caractéristiques des mucines. Les mucines sont reconnues entre autre pour jouer un rôle au niveau de la cytoprotection, du maintien de la viscosité et de la reconnaissance cellulaire (Strous et Dekker, 1992). La ressemblance aux mucines n'est pas attribuable à une similitude de séquences mais bien à certaines caractéristiques biochimiques. Les mucines ont généralement un taux élevé de résidus sérines et thréonines (ce qui explique leur haut taux de O-glycosylation), prolines et glycines. Les mucines présentent également des répétitions en tandem ainsi qu'un polymorphisme allélique. L'oviductine montre toutes ces caractéristiques. La majeure partie de sa O-glycosylation est présente dans la partie C-terminale où l'on retrouve la plus forte proportion de sérines et thréonines. L'oviductine possède également une série de répétitions de 15 a.a., ces répétitions sont au nombre de 5, 6 ou 7 chez le hamster (Malette et coll., 1995b). Le polymorphisme pourrait être expliqué justement par la délétion d'une ou deux de ces répétitions. Ces caractéristiques permettent donc de classer l'oviductine parmi la famille des mucines.

1.4 Les rôles possibles de l'oviductine.

1.4.1 Effet sur la réaction acrosomique, l'interaction des gamètes et la fécondation.

Malgré toutes ces connaissances sur la protéine, son rôle biologique demeure énigmatique. Parmi les hypothèses proposées, celle d'un effet sur la réaction acrosomique est la mieux documentée. D'une part, les sécrétions de l'oviducte stimulent la réaction acrosomique (Gutiérrez et coll., 1993). D'autre part, ces mêmes sécrétions expliqueraient la plus grande activité d'induction de la réaction acrosomique par la zp d'ovocytes tubaires, comparativement à la zone pellucide d'ovocytes ovariens (Yang et Yanagimachi, 1989). Selon Boatman (1994a), l'oviductine augmenterait la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide ainsi que l'induction de la réaction acrosomique. Toujours selon Boatman et Magnoni (1994b), l'oviductine a la propriété de se lier *in vitro* au croissant acrosomal des spermatozoïdes. O'Day-Bowman et coll. (1996) ont observé que le nombre de spermatozoïdes liés à la zone pellucide d'ovocytes ovariens en présence d'oviductine était significativement supérieur à celui obtenu en absence d'oviductine. D'autres rôles ont été proposés au niveau de l'interaction des gamètes et de la fécondation. Sakai et coll. (1988) démontrèrent qu'un anticorps anti-oviductine de hamster inhibe la fécondation *in vitro*. De plus, Boatman et Magnoni (1994b) découvrirent que l'incubation d'ovocytes ovariens avec de l'oviductine purifiée augmentait le pourcentage de pénétration par les spermatozoïdes. Cependant, pour ce qui est de la fécondation, différentes études ont montré que la contribution de l'oviductine à ce phénomène serait négligeable. En effet, les résultats de la fécondation *in vitro* chez l'humain, effectuée en absence d'oviductine, démontrent qu'elle n'est pas essentielle à ce niveau puisqu'il est possible d'atteindre un taux de fécondation de l'ordre de 82%

(Barnett et coll. 1992). L'oviductine pourrait donc favoriser la fécondation sans être indispensable.

1.4.2 Effet sur le développement embryonnaire.

Ménézo et coll. (1989) démontrèrent que le nombre d'embryons s'étant développés est augmenté par coincubation de jeunes embryons avec des oviductes isolés. Carney et coll. (1990) et Broermann et coll. (1989) confirmèrent ce résultat en utilisant des cellules tubaires ou un milieu conditionné par l'oviducte. D'après ces résultats, une substance produite par l'oviducte stimulerait le développement embryonnaire. Cependant, avant d'attribuer ce rôle spécifiquement à l'oviductine, le développement embryonnaire devrait être évalué en présence d'oviductine purifiée. De plus, lors des études effectuées avec des cellules de l'oviducte, ces cellules ont présenté des transformations fibroblastiques dans plusieurs cas et le stade du cycle oestral ne semble pas influencer leur effet bénéfique sur la survie de l'embryon.

2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Une autre fonction de l'oviductine liée au développement embryonnaire pourrait être envisagée. D'une part, il est connu depuis longtemps que le développement de l'embryon ne dépasse pas un certain stade au niveau de l'oviducte (Adams, 1958). En effet, des zygotes maintenus au niveau de l'oviducte ne dépassent pas le stade blastocyste, même après transfert dans l'utérus d'une femelle pseudogestante. Donc on peut supposer qu'un agent inhibiteur se retrouve au niveau de l'oviducte afin de ralentir le développement de l'embryon. D'autre part, l'embryon

à compter du stade 2-cellules à la capacité d'internaliser et de métaboliser l'oviductine (Kan et coll., 1993). Des études préliminaires effectuées chez le bovin ont montré un effet négatif d'un peptide synthétique sur le développement embryonnaire. Ce peptide (P-563) comporte 20 acides aminés localisés dans la partie N-terminale de l'oviductine de hamster. L'effet de P-563 fut étudié à toutes les étapes du développement embryonnaire *in vitro*. Après 48 heures d'incubation dans le milieu Ménézo B2, les embryons témoins et traités montrent sensiblement le même taux de clivage (2- et 4-cellules.), soit 76 et 62% respectivement. Cependant, après 7 jours de culture, le taux de développement de blastocystes dans le groupe témoin atteint 47% tandis que celui des embryons traités n'est que de 4%. Nous proposons donc que l'oviductine, internalisée et métabolisée par l'embryon, pourrait être cet agent inhibiteur du développement dans l'oviducte afin que l'embryon n'atteigne pas le stade implantatoire avant son arrivée dans l'utérus. Il a été démontré que l'oviductine est complètement absente dans l'utérus au moment de l'implantation, l'embryon pourrait donc y poursuivre son développement, atteindre le stade implantatoire et s'implanter finalement dans l'endomètre. Donc l'oviductine pourrait être un facteur permettant d'empêcher les grossesses ectopiques.

Le premier objectif était de vérifier l'effet possible de l'oviductine sur le développement embryonnaire. Nous devions donc disposer de quantités suffisantes d'oviductine purifiée. Cependant, l'oviductine étant fortement glycosylée, sa purification par affinité aux lectines est difficile. Nous avons donc choisi de produire une oviductine recombinante (région mucine) de hamster (rhaOvi_m) dans des bactéries spécifiques à l'expression protéique, M15 [pREP4]. Le choix de produire l'oviductine recombinante dans un système bactérien (protéine non-glycosylée) se justifie par le fait que l'oviductine internalisée est retrouvée dans les voies endocytiques-lysosomales, donc est sous forme modifiée probablement au niveau de

sa glycosylation. De plus, lors des expériences préliminaires, le peptide utilisé (P-563) était formé d'une séquence de 20 acides aminés non-glycosylés. Lorsque cette protéine recombinante fut produite et purifiée, nous avons été en mesure de vérifier notre hypothèse en testant son effet sur le développement embryonnaire bovin.

Un deuxième objectif consistait à développer les outils nécessaires à l'étude du métabolisme de l'oviductine internalisée par l'embryon. Un anticorps reconnaissant un épitope protéique nous permettra de documenter le métabolisme de l'oviductine internalisée par l'embryon. Nous avons donc produit des anticorps polyclonaux chez le lapin en utilisant l'oviductine recombinante partielle de hamster comme immunogène. Ces anticorps furent purifiés par chromatographie sur protéine-A et par affinité. Les anticorps purifiés ont été subséquentement caractérisés quant à leur spécificité par immunodétection sur transferts de type Western, par immunofluorescence et par immunocytochimie.

3. MATERIEL ET METHODES

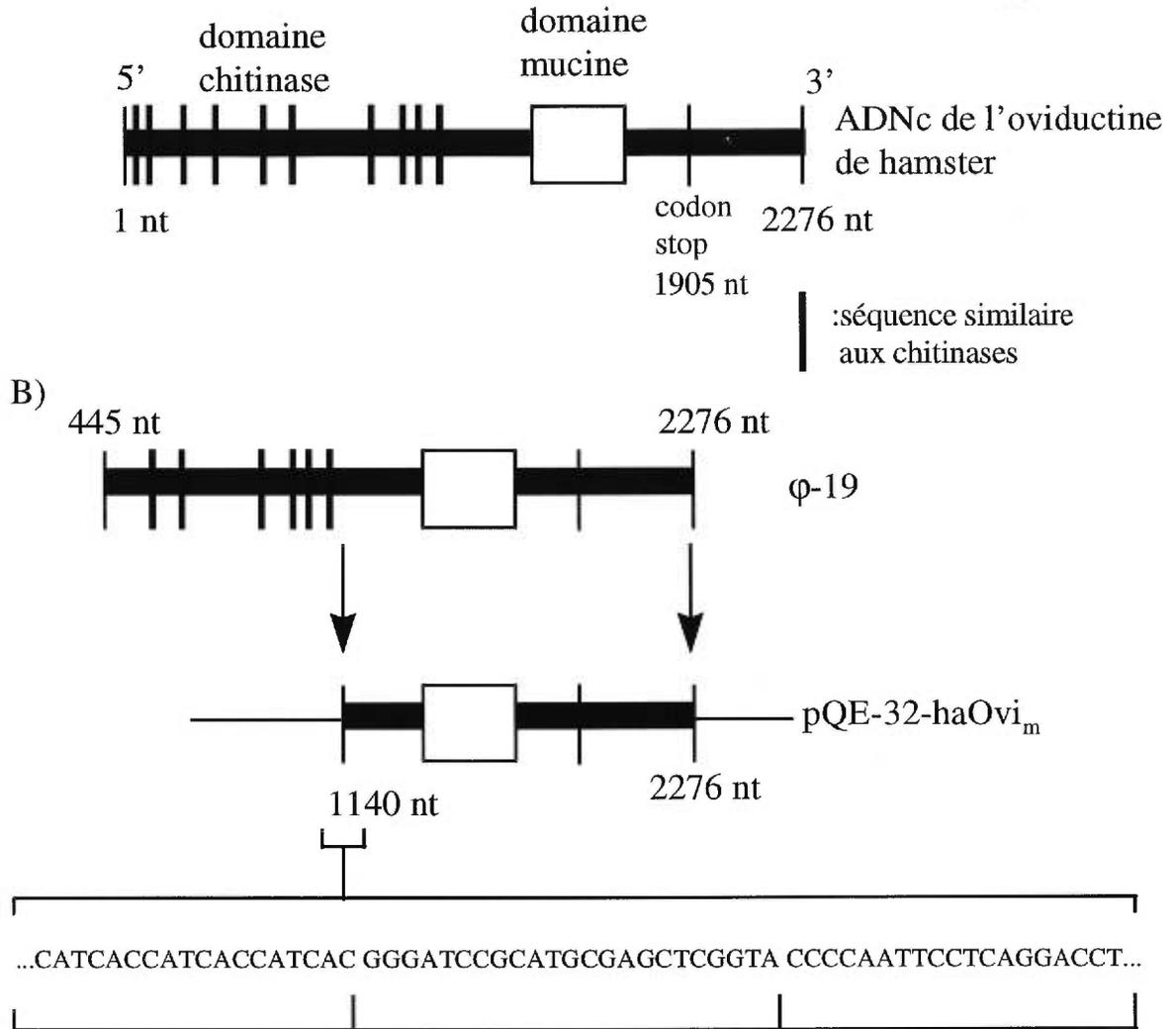
3.1 L'expression de la portion mucine de l'oviductine de hamster.

3.1.1 Clonage de l'ADNc de la portion mucine de l'oviductine de hamster.

Le clone d'ADNc de l'oviductine de hamster (phage-19; Paquette et coll., 1995) a été digéré par les enzymes de restriction *Apa I* et *EcoR I* afin de produire un fragment désigné haOvi_m (nt 1140-2276 de l'ADNc complet). Il est à noter que la portion clonée représente une partie de la séquence codante de l'oviductine de hamster ainsi que la partie 3' non-traduite suivant le codon "stop" (nt 1905 à 2276). Le fragment cloné code pour le domaine mucine de l'oviductine de hamster (Malette et coll., 1995c) (Fig. 2). Le vecteur d'expression utilisé était pQE-32 (Quiagen, Mississauga, ON, Canada), il a été digéré par l'enzyme de restriction *Sma I*. Le fragment haOvi_m ainsi que le vecteur digéré ont été traités à l'ADN polymérase T4 afin de produire des bouts francs et ligasés par l'ADN ligase T4 à la température de la pièce pendant 16 h. Ce clonage a été effectué de sorte que le fragment haOvi_m soit dans le même cadre de lecture que la séquence de 6 histidines localisée en amont du site de multiclonage (Fig. 2b,c). Afin de confirmer le cadre de lecture, la jonction vecteur-haOvi_m a été séquencée par la méthode de Sanger (Sanger et coll., 1977) utilisant la trousse "the Sequenase 2.0" (U.S.B. Cleaveland, OH).

A)

17



C)

Séquence déduite

6 histidines site de multiclonaage rhaOvi_m

H-H-H-H-H-H-G-I-R-M-R-A-R-Y-P-N-S-S-G-P

Séquence obtenue

par microséquenceage

H-H-H-H-H-H-G-I-R-M-R-A-R-Y-P-N-X-X-G-P

Fig. 2. Expression de rhaOvi_m par *E. coli*.

A) ADN complémentaire de l'oviductine de hamster.

B) Représentation schématique du clone pQE-32-haOvi_m exprimé chez *E. coli*.C) Résultats du microséquenceage de rhaOvi_m

3.1.2 Production de rhaOvim.

La construction pQE-32-haOvim a été utilisée pour transformer une souche de bactéries *E.coli* spécifique à l'expression, M15 [pREP4], selon le protocole habituel (Ausubel et coll., 1996). Les bactéries transformées ont poussé dans un milieu SOB contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 25 µg/mL de kanamycine, à 37°C avec agitation afin de sélectionner les bactéries transformées. A une densité cellulaire correspondant à $A_{600} = 0,7-0,9$ AU, l'expression de rhaOvim a été induite par l'addition de 1 mM d'IPTG. Après trois heures d'incubation, les cellules ont été sédimentées par centrifugation à 4000 g x 20 min, resuspendues dans 20 mL de tampon de lyse (urée 8 M, NaH_2PO_4 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0) et incubées 16 h à 4°C avec agitation.

Des bactéries M15 compétentes mais non-transformées ont servi de témoin. Celles-ci ont été traitées selon le même protocole que les bactéries transformées. Des aliquotes de 1 mL des cultures avant et après induction ont été conservés afin de les analyser par électrophorèse. Une protéine recombinante non apparentée à l'oviductine a également été produite, en utilisant une construction contenant la séquence de la protéine DHFR fournie par la compagnie Quiagen. Cette protéine fut purifiée selon le protocole décrit ci-dessous.

3.1.3 Purification et renaturation de rhaOvim.

Le lysat bactérien a été centrifugé à 10 000 g x 10 min et le surnageant appliqué sur une colonne Ni-NTA (Quiagen). La colonne a été lavée abondamment avec un tampon de lavage (urée 8 M, NaH_2PO_4 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 6,3) jusqu'à ce que A_{280} soit inférieur à 0,01 AU. La protéine rhaOvim est alors éluée avec

15 mL de tampon d'éluion (urée 8 M, NaH_2PO_4 0,1 M, Tris-HCl 0,01M, pH 4,5). Le pH de l'éluat a été ajusté à 8,0, puis la protéine rhaOvim immobilisée à nouveau sur la résine Ni-NTA. Par la suite, la protéine rhaOvim immobilisée a été mise en présence d'un tampon de renaturation (NaH_2PO_4 0,1 M, pH 8,0) pendant 30 min à 4°C avec agitation. Après cette incubation, la protéine liée a été éluée avec 20 mL de tampon d'éluion (NaH_2PO_4 0,1 M, pH 8,0, EDTA 0,1M), dialysée contre 1L d'un tampon bicarbonate d'ammonium 0,05 M pendant 1 h et 500 mL pendant 16 h à 4°C et lyophilisée. La protéine rhaOvim a été finalement resuspendue dans 2 mL d'eau distillée et analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12%.

3.1.4 Détermination de la concentration protéique et séquençage.

La concentration de rhaOvim a été mesurée par la méthode de Macart et Gerbault (1982). L'identité de la protéine recombinante a été confirmée par séquençage. Le séquençage en N-terminal de la protéine transférée sur membrane de PVDF Problot a été obtenu par la technique de dégradation d'Edman. Le séquençage a été effectué à l'aide d'un séquenceur automatisé de type "Gas-phase Sequencer", modèle 470A.

3.2. Production d'anticorps contre la protéine rhaOvim.

3.2.1 Préparation de l'immunogène et immunisation.

L'immunogène, rhaOvim, a été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12%. Suite à la migration, la portion du gel correspondant à la Mr

attendue de la protéine rhaOvim (~ 43 kDa) a été coupée et électroéluée à l'aide de l'appareil "Electro-eluer model 422" (Bio-Rad) pendant 3 h à 15 mA suivant les recommandations du fournisseur. Un lapin mâle blanc (Charles River Inc., St-Constant, Qc, Canada) a été immunisé par voie intradermique (sites multiples) avec premièrement 1 mg de rhaOvim dissoute dans 0,6 mL de PBS (NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M) et émulsifiée avec l'adjuvant complet de Freund (1:1, v/v). Les injections subséquentes contenaient 1,0, 0,5 et 0,6 mg de l'immunogène dans 1 mL de PBS avec un volume égal d'adjuvant incomplet. Les injections de rappel ont été administrées à des intervalles de 4 semaines. Des échantillons sanguins ont été prélevés 2 semaines suivant chaque dose de rappel et le titre d'anticorps mesuré par ELISA et immunodétection sur transferts de type Western. Le serum d'un lapin n'ayant reçu aucune injection a été utilisé comme témoin.

3.2.2 Détermination du titre d'anticorps par immunodétection sur transferts de type Western et par ELISA.

3.2.2.1 Immunodétection sur transferts de type Western

La préparation de rhaOvim (5 µg/µL) a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% puis transférée sur membrane de PVDF à l'aide du système de transfert Bio-Rad. Les transferts sont effectués à courant constant de 0,1 A pendant 16 h. La membrane est saturée dans une solution de gélatine 3%/TBS pendant 1 h puis lavée 3 fois avec du TBS (5 min). Les sérums, correspondant à 4 et 6 semaines suivant la première injection d'antigène, ont été ajoutés à la membrane (1 :1000, 1 :10 000 et 1 :100 000 dans gélatine 1%/TBS), pendant 1 h puis la membrane lavée 3 fois avec du TBS (5 min). L'anticorps secondaire, IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplé

à la peroxidase HRP (1:3000 dans gélatine 1%/TBS) (Bio-Rad), a été incubé pendant 1 h puis la réaction immunologique finalement révélée dans une solution de développement contenant le substrat de la peroxidase, le 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma). Le sérum préimmun est également utilisé comme témoin aux mêmes dilutions que le sérum immun.

3.2.2.2 ELISA

Les titres de chaque sérum immun, après 13 semaines d'immunisation, et du sérum témoin ont été mesurés par une technique d'ELISA sur des plaques à 96 puits Reacti-Bind (Pierce, Rockford, IL). Des dilutions sériées de rhaOvim (0 à 0,150 µg/mL de PBS) ont été incubés dans les puits pendant 16 h à 4°C. Après un lavage avec 200 µL de PBS, les puits ont été saturés pendant 1 h avec 200 µL de BSA 3%/PBS. Par la suite, 100 µL de dilutions sériées des sérums (dans BSA 3%/PBS) ont été ajoutées et incubées 2 h à 25°C. Finalement, 100 µL d'un IgG de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la HRP (Bio-Rad) ont été ajoutés aux puits, suivi d'une incubation de 2 h à 25°C. Chacune de ces étapes était suivie d'un lavage avec 200 µL de BSA 3%/PBS. L'étape de révélation a consisté à ajouter 200 µL d'une solution de développement (90 mL d'un tampon phosphate-citrate, pH 5,0 contenant 36 mg de *O*-phenylenediamine et 30 µL de H₂O₂ 30% v/v). La réaction a été arrêtée en ajoutant 50 µL de H₂SO₄ 4 N et l'absorbance mesurée à 490 et 650 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Molecular Devices, Sunny Vale, CA).

3.2.3 Purification des anticorps polyclonaux par chromatographie sur protéine A.

Dans une première étape, les fractions IgG des sérums immuns et du sérum témoin ont été isolées par chromatographie sur protéine A-agarose. Des billes d'agarose "Affi-Gel protein A" (Bio-Rad) ont été équilibrées avec 5 mL de tampon de liaison, les sérums ont été par la suite appliqués sur la résine et lavés avec 15 mL de tampon de liaison. La fraction IgG a été éluée avec 5 mL de tampon d'éluion à pH 3,0 et collectée dans un tube contenant 1,6 mL de tampon Tris-HCl 1 M, pH 9,0 afin d'augmenter le pH et ainsi minimiser l'exposition des IgG à un pH très acide.

3.2.4 Purification des anticorps polyclonaux par chromatographie d'affinité.

Pour la purification par affinité sur rhaOvim, 10 μ L de résine Affigel 15 (Bio-Rad) ont été premièrement lavés 3 fois avec 150 μ L de tampon acétate de sodium froid (10 mM, pH 4,5). Par la suite, 100 μ g de rhaOvim dans 50 μ L de tampon acétate de sodium (10 mM, pH 7,5) ont été couplés à la résine à 4°C pendant 4 h. Après une brève centrifugation, le surnageant a été enlevé et 10 μ L d'éthanolamine ajoutés et incubés 1 h afin de bloquer les sites résiduels. La résine a été lavée avec 100 μ L de tampon acétate de sodium (10 mM, pH 7,5) et 100 μ L de tampon Tris (10 mM, pH 7,4). La fraction IgG (150 μ g) purifiée sur protéine A a été incubée avec la protéine rhaOvim immobilisée à la résine pendant 16 h à 4°C suivi par une centrifugation et un lavage avec 200 μ L de NaCl 1,0 M. Les anticorps ont été élués avec 100 μ L de tampon glycine-HCl 10 mM pH 2,5 et l'éluat ajouté à 35 μ L de Tris-HCl 1M pH 9,0 contenant 10% d'éthylène glycol.

3.3 Détermination de la spécificité des anticorps polyclonaux anti-rhaOvim.

3.3.1 Purification d'oviductine sur agarose couplé à des agglutinines d'*Helix pomatia*.

Des oviductes de hamsters femelles (*Mesocricetus auratus*) (Charles River Inc.) âgées de 8 semaines ont été incubés pendant 4 h dans un milieu TALP-2 (voir Annexe 1) à raison de 8 oviductes/mL. A la fin de l'incubation, les oviductes ont été lavés et perfusés afin de libérer leur contenu avec 0,5 mL de milieu TALP-2. L'inhibiteur de protéase, PMSF, a été ajouté à une concentration finale de 0,2 mM. Ce milieu contenant le fluide tubaire a été ajouté à 100 µL d'agarose couplé à des agglutinines d'*Helix pomatia* (Sigma, Oakville, ON) dans un tube eppendorf de 500 µL et incubé à 25°C pendant 30 min. La résine a été lavée avec 10 volumes de NaCl 0,3 M/PBS et cinq volumes d'une solution de glycine à 0,2 M, pH 2,5 contenant NaN₃ 0,003 M. L'oviductine a été éluée avec cinq volumes de N-acétyl- α -D-galactosamine 0,1 M dissoute dans la solution de glycine. Un volume équivalent à 100 µL a été appliqué sur un gel de polyacrylamide 9% suivi d'un transfert sur une membrane PVDF.

3.3.2 Immunodétection sur transferts de type Western de rhaOvim et du DHFR recombinants.

La spécificité des anticorps purifiés a été déterminée par immunodétection sur transferts de type Western. Premièrement 5 µg de rhaOvim sont analysés par

électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% puis transférés sur membrane de PVDF. L'immunodétection est par la suite effectuée selon le protocole décrit précédemment. La dilution des anticorps anti-rhaOvim purifié par chromatographie sur protéine A a été de 1 :50 000 et 1 :100 000. Pour les anticorps anti-rhaOvim purifiés par affinité, ceux-ci ont été dilués 1 : 1 000 et 1 :5 000. Le DHFR recombinant a également été analysé en suivant la même procédure que lors de l'immunodétection de rhaOvim.

3.3.3 Immunodétection sur transferts de type Western des homogénats d'ovaires et d'utérus.

Les utérus et ovaires de hamsters femelles âgées de 8 semaines (Charles River Inc) ont été prélevés et lavés dans du tampon A froid (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, DTT 0,5 mM). Les tissus ont par la suite été pesés et coupés en petits morceaux suivi d'une homogénéisation dans 2,5 volume (v/w) de tampon B (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glycérol 10%, acétate de magnésium 5 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 150 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 1,0 mM) à l'aide d'un polytron Braun-Sonic (Brinkmann, Mississauga, ON, Canada). Une aliquote de 20 µL de chaque homogénat a été prélevée pour dosage de protéines selon la méthode de Macart (1982). Finalement 20 µg ont été analysés sur un gel de polyacrylamide 12%, transférés sur membrane de PVDF comme décrit précédemment pour l'immunodétection.

3.3.4 Immunocytochimie sur coupes d'oviducte

Les oviductes de hamsters femelles ont été prélevés, lavés avec du PBS et fixés dans une solution de glutaraldéhyde (2,5% dans un tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4) pendant 2 h à la température de la pièce. Par la suite, ils ont été lavés 3 fois dans un tampon cacodylate 0,1 M puis conservés à 4°C. Les tissus ont ensuite été préparés pour l'immunocytochimie. Ils ont premièrement été enrobés dans de l'agar, déshydratés dans des bains successifs de méthanol à différentes concentrations puis graduellement infiltrés et enrobés dans une solution d'enrobage, le Lowicryl K4M (Bendayan, 1984). Finalement des sections minces de 1 µm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un ultramicrotome LKB et montées sur des grilles de nickel.

Les sections d'oviductes ont été incubées dans une solution de PBS (0,01 M, pH 7,4) contenant 1% d'ovalbumine pendant 5 min afin d'éliminer les sites potentiels de fixation non-spécifique des anticorps. Puis l'anticorps primaire, anti-rhaOvim purifié par affinité et dilué 1:3 dans du PBS 0,01 M, a été incubé avec les échantillons pendant 2 h à la température de la pièce. Suite à cette incubation, 3 lavages ont été effectués avec du PBS 0,01 M. La détection des sites de fixation de l'anticorps anti-rhaOvim a été faite à l'aide de la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal de 8 nm. Le complexe protéine A-or colloïdal a été dilué 1:5 (PBS 0,01 M) et incubé 1 h à la température de la pièce. Les sections ont par la suite été lavées une première fois avec du PBS et une seconde fois avec de l'eau bidistillée. Les échantillons ont finalement été contre-colorés avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb et observés sous microscope électronique Philips 300. Afin de déterminer la spécificité de l'immunodétection, le témoin suivant a été effectué: des sections d'oviductes ont été mises en présence de sérum pré-immun purifié par chromatographie sur protéine A.

3.3.5 Immunofluorescence sur des embryons 8-cellules

Des hamsters femelles âgées de 8 semaines ont été accouplées et les embryons ont été récupérés au stade 8-cellules (72 h post-accouplement) par perfusion des oviductes avec du milieu HECM-2 (annexe 2). Les embryons ont été lavés avec du PBS et incubés avec les anticorps anti-rhaOvim purifiés par affinité (1:50 dans PBS). Les embryons ont ensuite été incubés avec l'anticorps secondaire, IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome CY3 (Sigma). Les embryons ont été lavés 3 fois avec du PBS après chaque incubation. Les embryons ont été montés sur des lames traitées avec une solution de poly-L-lysine 0,01% (Sigma) et recouverts de 20 µL de glycérol 50% et d'une lamelle. La fluorescence a été observée avec un microscope à fluorescence de type Leitz Diaplan.

3.4 Développement embryonnaire bovin.

3.4.1 Cueillette des ovocytes ovariens, fécondation in vitro et développement embryonnaire bovin.

La première étape consistait à stériliser l'oviductine en solution dans du milieu de développement embryonnaire Ménézo B2. La protéine rhaOvim a été filtrée sur nanosep 10K (Gelman Sciences, Qc, Canada) par centrifugation à 5 000g x 30 min et lavée à plusieurs reprises avec le milieu Ménézo B2. La protéine a été redissoute à une concentration finale de 0,1 mg/mL et stérilisée par filtration sur membrane de 0,22 µm.

Le protocole de développement embryonnaire bovin s'étale sur une période de 10 jours allant de la cueillette des ovocytes ovariens au calcul du pourcentage d'éclosion, ce protocole est effectué par l'entreprise Alliance Boviteq de St-Hyacinthe. Les ovocytes ovariens sont premièrement recueillis par ponction des follicules, lavés et incubés dans un milieu de maturation à 37°C pendant 24 h (jour-1). Au jour-2, les spermatozoïdes sont ajoutés afin de réaliser la fécondation *in vitro*. Les embryons sont par la suite lavés et transférés dans un milieu de développement embryonnaire (jour-3). La rhaOvim (0,05, 0,01, 0,001, et 0,0001 µg/µL) est ajoutée au milieu de développement embryonnaire à cette dernière étape laquelle correspond au début de la maturation *in vitro* des embryons. La rhaOvim a été mise en présence des embryons à chacun des changements de milieu aux jours 4, 5 et 7. L'effet de la rhaOvim a été observé à plusieurs stades durant les 10 jours, par exemple, lors de la mesure du taux de clivage (jour-4), du nombre de blastocystes (jour-7) et au calcul du pourcentage d'éclosion (jour-10).

Deux témoins ont également été utilisés. Le premier témoin était constitué du milieu de développement embryonnaire seul, sans rhaOvim. Le deuxième correspondait aux produits de bactéries M15 compétentes mais non-transformées par la construction pQE-32-rhaOvim; ces produits ont été préparés selon le même protocole d'expression et de purification utilisé pour les bactéries transformées. Le volume du deuxième témoin à ajouter au milieu de développement embryonnaire a été déterminé selon le volume de la solution de rhaOvim utilisé aux différentes concentrations testées.

3.4.2 Augmentation de la solubilité de rhaOvim.

La rhaOvim* a été exprimée à partir du même clone ayant servi à la production de rhaOvim mais en utilisant un protocole de purification différent. Brièvement, les bactéries compétentes M15 ont été transformées par la construction pQE-32-haOvim, induites à l'IPTG, centrifugées à 4000 g x 20 min, resuspendues dans 20 mL de tampon de lyse (urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0) et incubées 16 h à 4°C avec agitation. La suite du protocole est une adaptation de la méthode de purification de Holzinger et coll. (1996). Une centrifugation à 14 000g x 30 min a été effectuée afin d'éliminer les débris cellulaires. La résine Ni-NTA a été équilibrée dans 20 mL de tampon de liaison (urée 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0), le surnageant a été ajouté à la résine et incubé 2 h à 4°C. La colonne a été lavée abondamment avec un premier tampon de lavage (urée 6 M, Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazole 20 mM) puis avec un second tampon (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 150 mM) jusqu'à A₂₈₀ soit inférieure à 0,02 AU. La protéine immobilisée a été éluée à l'aide d'un tampon contenant un agent chélateur, l'EDTA (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 150 mM, EDTA 50 mM). L'éluat a été dialysé contre 1 L de tampon TBS pendant 1 h, puis pendant 16 h contre 1 L du même tampon renouvelé. La protéine, rhaOvim*, purifiée a finalement été lyophilisée puis dissoute dans 2 mL d'eau distillée.

3.4.3 Test de solubilité

Les protéines recombinantes rhaOvim et de rhaOvim* (30 µg) ont été concentrées par centrifugation sur nanosep 10 K (Gelman Sciences) à 5 000 g x 30 min. Trois lavages ont été effectués avec un tampon phosphate 0,01 M à pH 7,5 ou un

tampon carbonate-bicarbonate 0,01 M à pH 10,5. Par la suite, rhaOvim et rhaOvim* ont été dissoutes dans 400 μ L du même tampon utilisé lors des lavages et incubés 1 h à 45°C. Finalement, rhaOvim et rhaOvim* ont été stérilisées par filtration sur membrane de 0,22 μ m (Gelman Sciences) et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12%.

4. RÉSULTATS

4.1 La production d'une oviductine recombinante partielle

4.1.1 Expression de rhaOvim

Tel que présentée à la Figure 3, la coloration du gel révèle la présence d'une nouvelle protéine suite à l'induction à l'IPTG des cellules M15 transformées avec le plasmide recombinant pQE-32-haOvim. Cette nouvelle protéine migre à une distance correspondante à une Mr de 43 kDa, ce qui correspond approximativement à la Mr attendue selon la séquence de l'ADNc clonée.

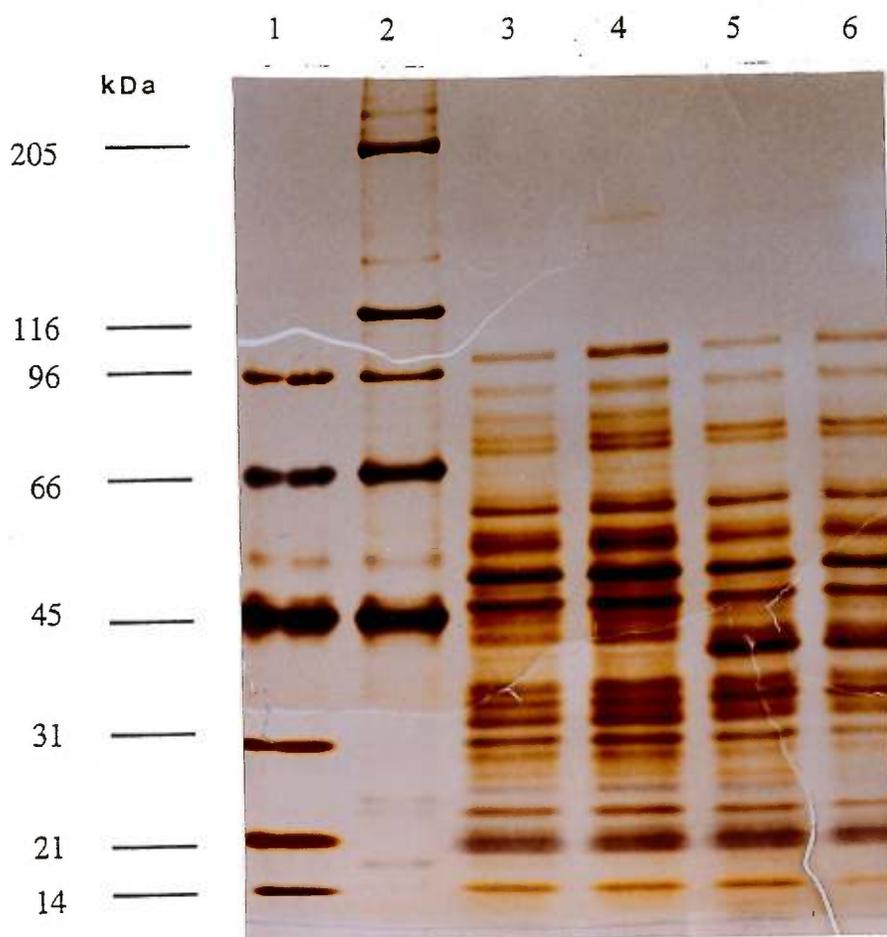


Fig. 3. Analyse de l'expression de rhaOvim dans *E. coli*.

Analyse sur gel de polyacrylamide 12% de l'expression de rhaOvim après induction (IPTG 1 mM, 3h, 37°C) des bactéries M15 contenant le clone pQE-32-haOvim. Coloration à l'argent (Morrisey et coll. 1981). Puits 1 et 2: marqueurs de poids moléculaire. Puits 3 et 4: extrait protéique de bactéries M15 non-induites à l'IPTG. Puits 5 et 6: extrait protéique de bactéries M15 induites à l'IPTG.

4.1.2 Purification et renaturation de rhaOvim

La purification de cette protéine recombinante s'est effectuée en conditions dénaturantes (urée 8 M) puisque celle-ci était localisée au niveau des corps d'inclusion lors de sa production. Le protocole de purification repose sur l'affinité de la séquence de 6 histidines, située à l'extrémité N-terminale de rhaOvim, pour le nickel associé à la résine de NTA (acide nitro-tri-acétique). La protéine rhaOvim se lie à la résine à pH 8,0 et les liaisons non-spécifiques ont été éliminées en diminuant le pH du tampon de lavage à 6,3. Finalement la protéine liée a été éluée par un tampon à pH 4,5, ce qui protone les histidines et empêche la liaison de rhaOvim à la résine. La protéine rhaOvim éluée a été transférée dans le tampon de lavage à pH 8,0 et remise sur colonne pour cette fois-ci éliminer l'urée et poursuivre avec l'étape de renaturation. La séquence de 6 histidines n'est pas supposée interférer avec la structure de la protéine donc la renaturation est effectuée sur la colonne afin d'éliminer les risques d'agrégation lors de l'éluion. La protéine rhaOvim a été incubée en présence du tampon de renaturation (phosphate 0,1 M) et elle est finalement éluée en ajoutant de l'EDTA. L'analyse par SDS-PAGE (Fig. 4) montre une bande majeure à 43 kDa avec quelques bandes mineures de plus faibles Mr. Après transfert sur membrane de PVDF, le microséquençage de l'extrémité N-terminale de la bande à 43 kDa a confirmé l'identité de la protéine rhaOvim (Fig. 1c). Les 21 premiers acides aminés séquencés incluent les 6 histidines servant à la purification, les dix acides aminés correspondant au site de multiclonaage dans le vecteur d'expression pQE-32 et les cinq premiers acides aminés correspondant à la séquence d'ADNc de l'oviductine clonée. Il est à noter que des cinq acides aminés de rhaOvim, trois ont été identifiés avec certitude tandis que les deux autres se confondaient avec le bruit de fond. Approximativement 1 mg de protéine recombinante a été obtenu par litre de milieu de culture.

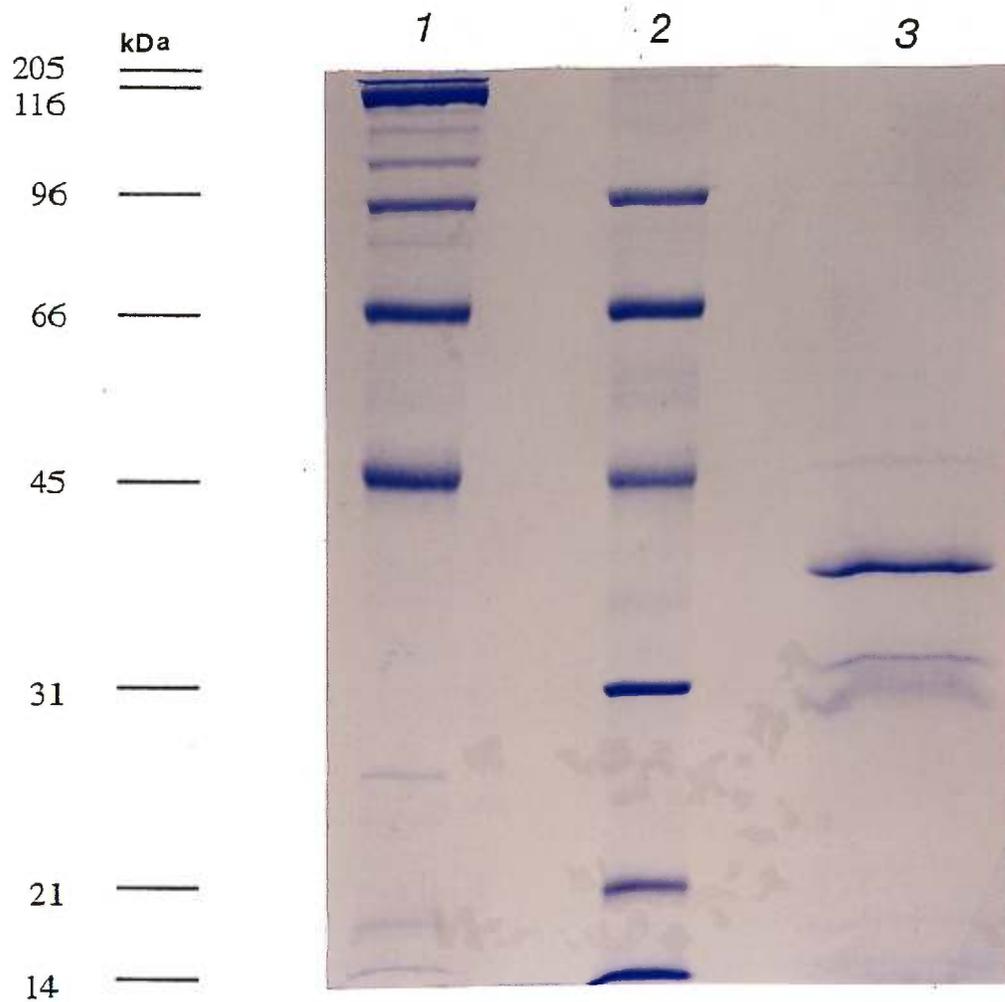


Fig. 4. Analyse de rhaOvim après purification par chromatographie d'affinité.

Après élution avec un tampon NaH_2PO_4 0,1 M-EDTA 0,1 M, 5 μg de rhaOvim (puits 3) ont été analysés sur gel de polyacrylamide 12%. Coloration au Bleu de Coomassie. Puits 1 et 2: marqueurs de poids moléculaire.

4.2 Anticorps polyclonaux anti-rhaOvim

4.2.1 Production et purification d'anticorps polyclonaux dirigés contre rhaOvim.

Puisque un des objectifs était de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre la séquence peptidique de l'oviductine, la bande à 43 kDa correspondant à rhaOvim a été électroéluée du gel de polyacrylamide et utilisée pour immuniser un lapin mâle. Le plus haut titre a été obtenu après trois doses de rappel tel que démontré par immunodétection sur transferts de type Western (Fig. 5) et ELISA (Fig. 6). Les anticorps ont été purifiés par chromatographie sur protéine A et par affinité. Pour la purification par affinité, la protéine rhaOvim a été immobilisée sur la résine Affi-gel permettant de purifier spécifiquement les anticorps dirigés contre la protéine recombinante. Les anticorps purifiés ont été testés par immunodétection sur transferts de type Western. Une réaction positive avec rhaOvim a été obtenue avec la fraction IgG purifiée sur protéine A, à une dilution aussi élevée que 1:100 000 et à une dilution de 1:5 000 pour les anticorps purifiés par affinité (Fig. 7).

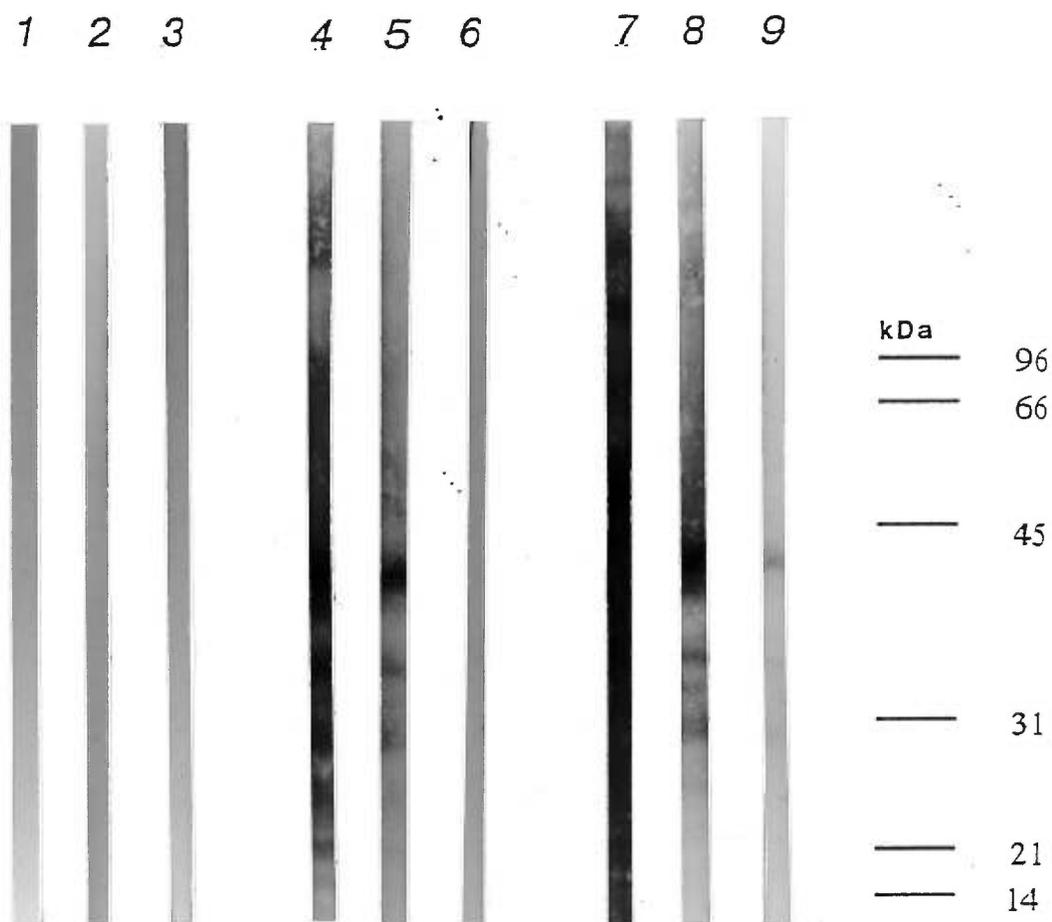


Fig. 5. Détermination du titre d'anticorps par immunodétection sur transferts de type Western.

Puits 1, 2, 3: 5 μg rhaOvim détectés avec le sérum préimmun dilué respectivement à 1 :1 000, 1 :10 000 et 1 :100 000.

Puits 4, 5, 6: 5 μg rhaOvim détectés avec le sérum immun, après 4 semaines d'immunisation, dilué respectivement à 1 :1 000, 1 :10 000 et 1 :100 000.

Puits 7, 8, 9: 5 μg rhaOvim détectés avec le sérum immun, après 6 semaines d'immunisation, dilué respectivement à 1 :1 000, 1 :10 000 et 1 :100 000.

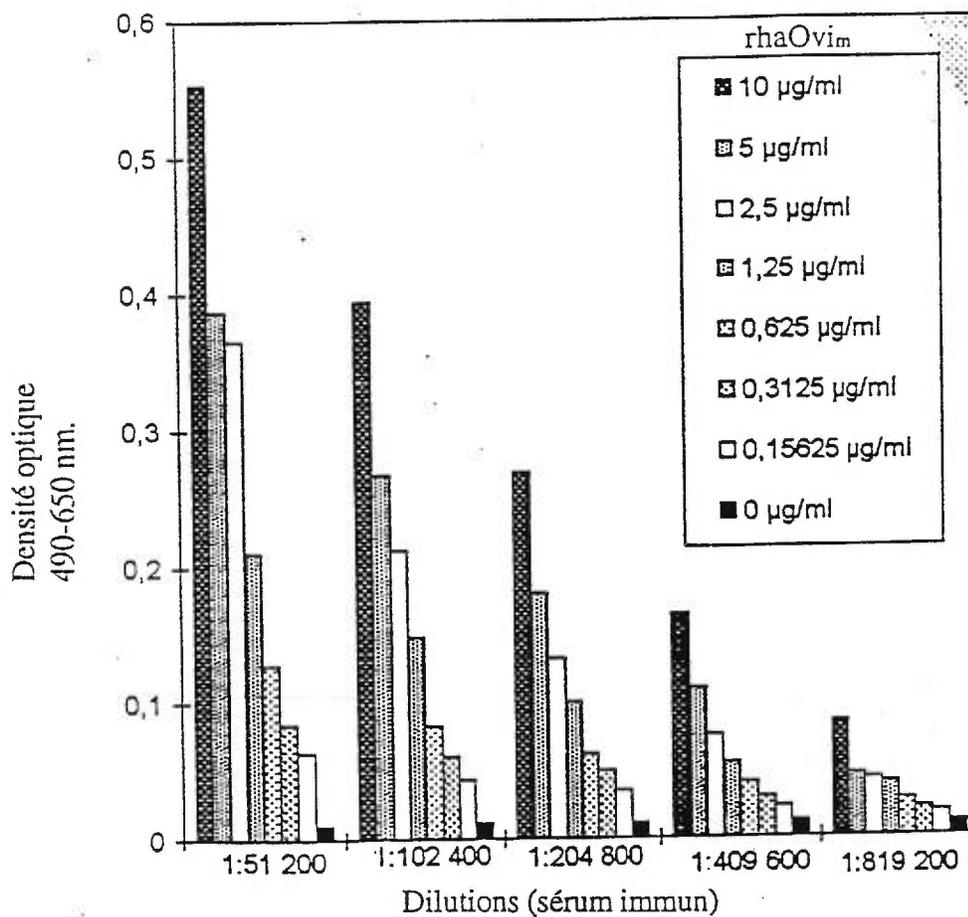


Fig. 6. Détermination du titre d'anticorps par ELISA.

Le sérum d'un lapin immunisé avec rhaOvim, après 13 semaines d'immunisation a été testé par ELISA à différentes dilutions ainsi qu'à différentes concentrations de rhaOvim. Les densités optiques ont été prises à 490 et 650 nm.

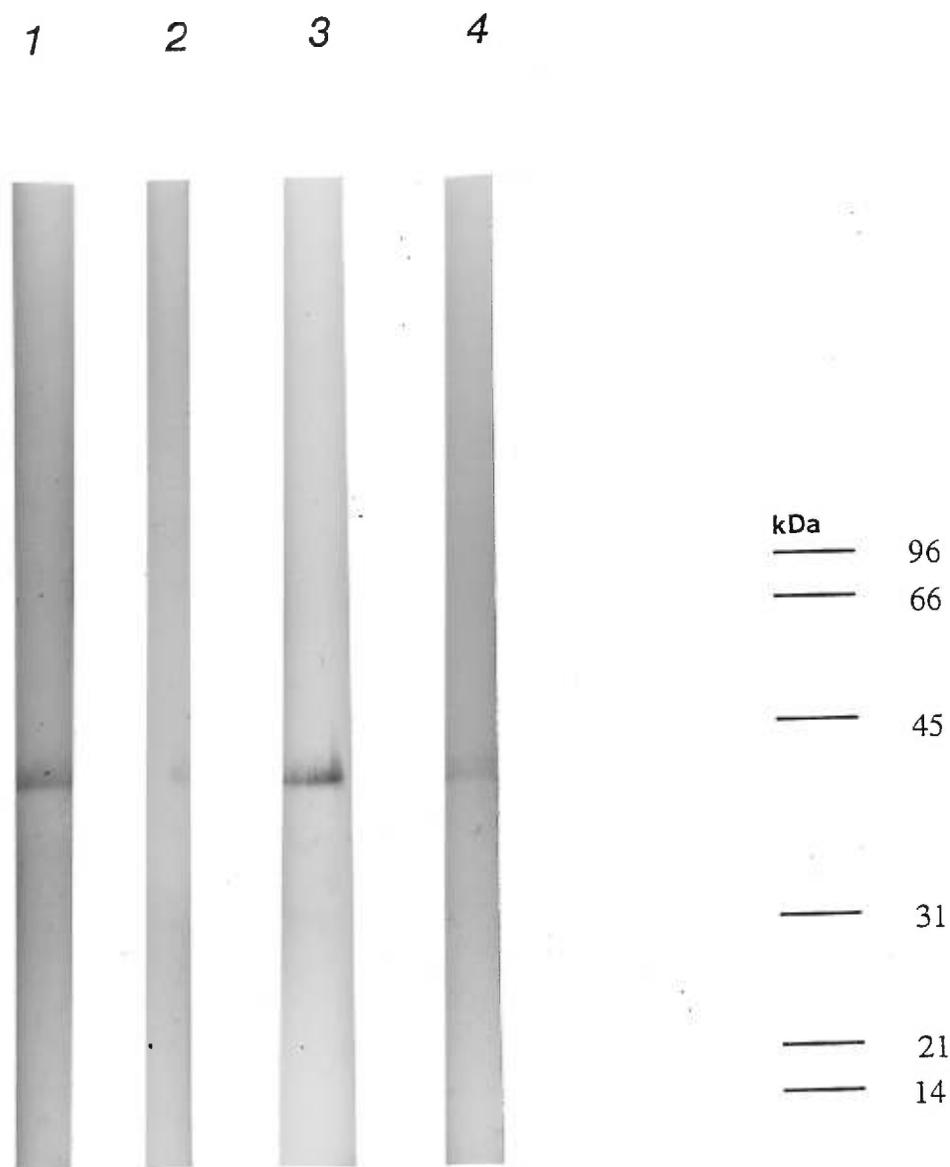


Fig. 7. Immunodétection sur transferts de type Western de rhaOvim avec les anticorps polyclonaux anti-rhaOvim purifiés par chromatographie sur protéine A et par affinité.

Puits 1 à 4: rhaOvim (5 μ g). Les échantillons des puits 1 et 2 ont été révélés à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-rhaOvim purifié par chromatographie sur protéine A (puits 1: dil. 1:50 000, puits 2: dil. 1: 100 000). Les échantillons des puits 3 et 4 ont été révélés à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-rhaOvim purifié par affinité (puits 3: dil. 1:1 000, puits 4: dil. 1: 5 000).

4.3 Spécificité des anticorps polyclonaux purifiés.

4.3.1 Immunoréactivité avec rhaOvim

La spécificité des anticorps purifiés a été testée par immunodétection sur transferts de type Western. Les anticorps, purifiés sur protéine A et par affinité, reconnaissent rhaOvim et détectent également les bandes de plus faibles Mr observées sur gel de polyacrylamide (Fig. 8). Par contre, les anticorps ne reconnaissent pas l'oviductine mature purifiée sur agarose couplé à des agglutinines d'*Helix pomatia*.

Cette oviductine mature est cependant détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal, AcM 4.12, reconnaissant un épitope glycosidique de la protéine (Fig. 8) Cette réactivité apparaît comme une large bande à environ 200 kDa et montrant l'hétérogénéité de la Mr de l'oviductine. Dans les mêmes conditions, les anticorps purifiés anti-rhaOvim n'ont pas détecté d'épitope dans les homogénats d'ovaires et d'utérus analysés (Fig. 9).

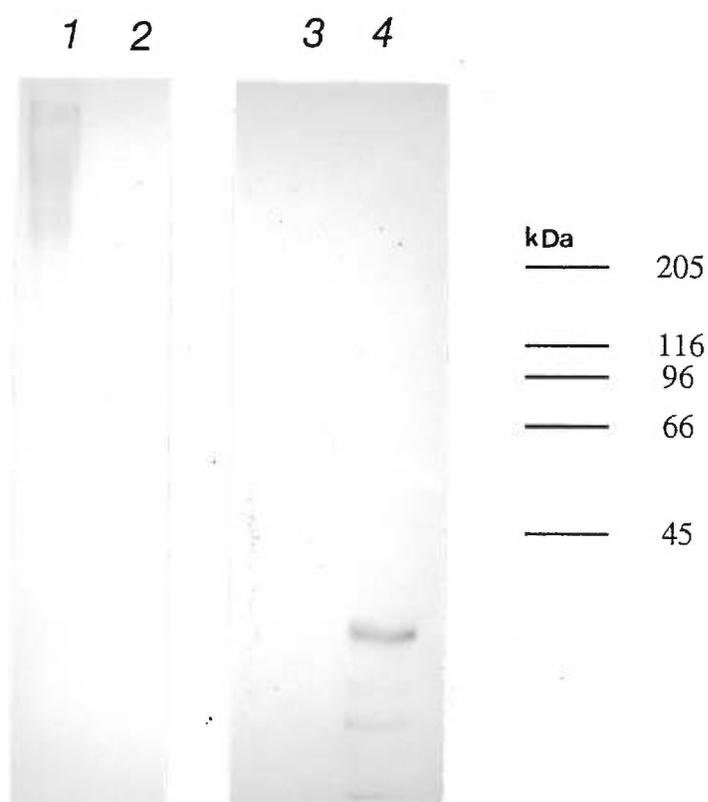


Fig. 8. Immunodétection sur transferts de type Western de rhaOvim et l'oviductine mature purifiée sur agarose couplé à des agglutinines d'*Helix pomatia*. à l'aide des anticorps polyclonaux anti-rhaOvim et l'anticorps monoclonal 4.12.

Puits 1 et 3: oviductine mature purifiée sur agarose couplé à des agglutinines d'*Helix pomatia*. Puits 2 et 4: rhaOvim (5 μ g). Les échantillons des puits 1 et 2 ont été révélés par l'anticorps monoclonal 4.12 (dil. 1:250). Les échantillons des puits 3 et 4 ont été révélés avec par l'anticorps polyclonal anti-rhaOvim (dil. 1:1 000).

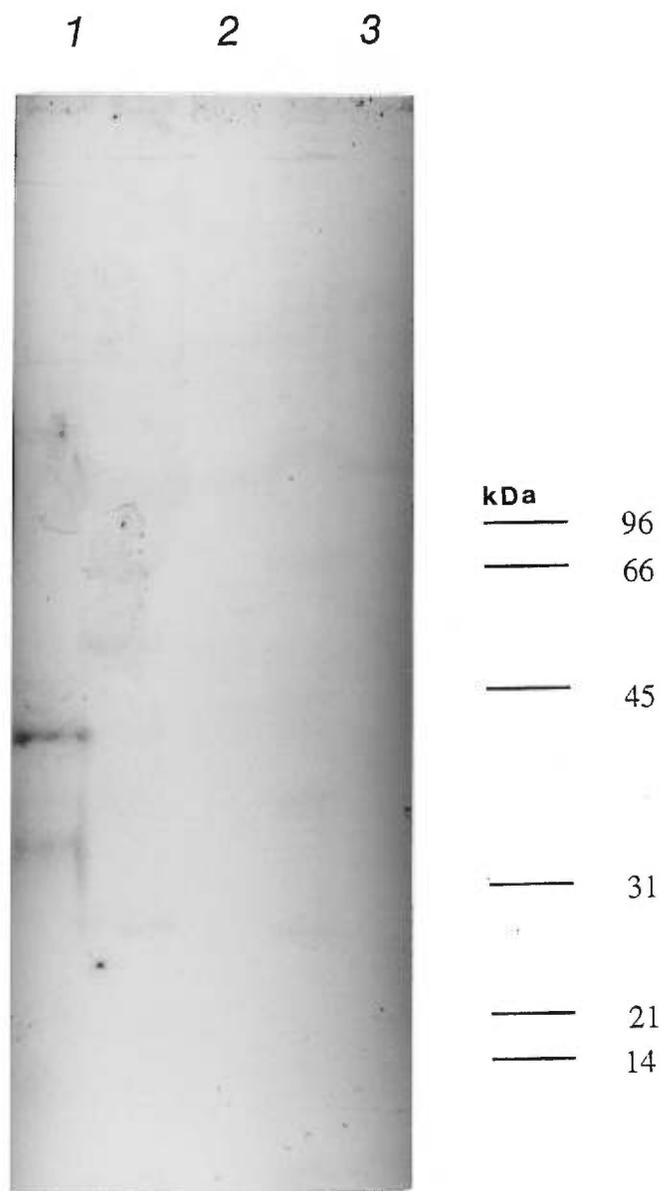


Fig. 9. Analyse de la spécificité des anticorps anti-rhaOvim.

Puits 1: rhaOvim (5 μ g). Puits 2: homogénat d'ovaires. Puits 3: homogénat d'utérus. Les anticorps polyclonaux anti-rhaOvim purifiés par affinité ont été dilués 1/1 000.

4.3.2 Immunodétection de rhaOvim en présence de DHFR recombinant.

Les anticorps anti-rhaOvim auraient pu être dirigés contre la séquence de 6 histidines localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine recombinante. La Fig. 10 démontre que les anticorps purifiés ne réagissent pas avec le DHFR recombinant (qui possède aussi les 6 histidines) alors qu'ils réagissent avec la rhaOvim analysée sous des conditions identiques.



Fig. 10. Immunodétection de rhaOvim et DHFR recombinant par les anticorps polyclonaux purifiés par affinité.

Puits 1: rhaOvim (5 µg). Puits 2: DHFR recombinant (5 µg). Les anticorps anti-rhaOvim ont été dilués 1/1 000.

4.3.3 Immunodétection d'oviductine sur coupes d'oviducte

Des coupes d'oviductes ont été analysées en immunocytochimie à l'aide de la protéine A couplée à l'or colloïdal. Nous avons observé que les anticorps purifiés par affinité reconnaissent l'oviductine localisée au niveau des granules de sécrétion des cellules sécrétrices de l'épithélium de l'oviducte (Fig. 11a). En effet, une grande concentration de particules d'or a été observée exclusivement au niveau des granules de sécrétion. Par contre, aucun marquage n'a été détecté dans les différentes structures cellulaires telles que le noyau et le cytoplasme. En guise de témoins, des coupes d'oviductes incubées avec les IgG du sérum pré-immun n'ont démontré aucun marquage (Fig. 11b), de même que des coupes d'ovaires incubées avec les anticorps anti-rhaOvim (données non-publiées). Les anticorps anti-rhaOvim purifiés démontrent donc une spécificité tissulaire, cellulaire et sub-cellulaire.

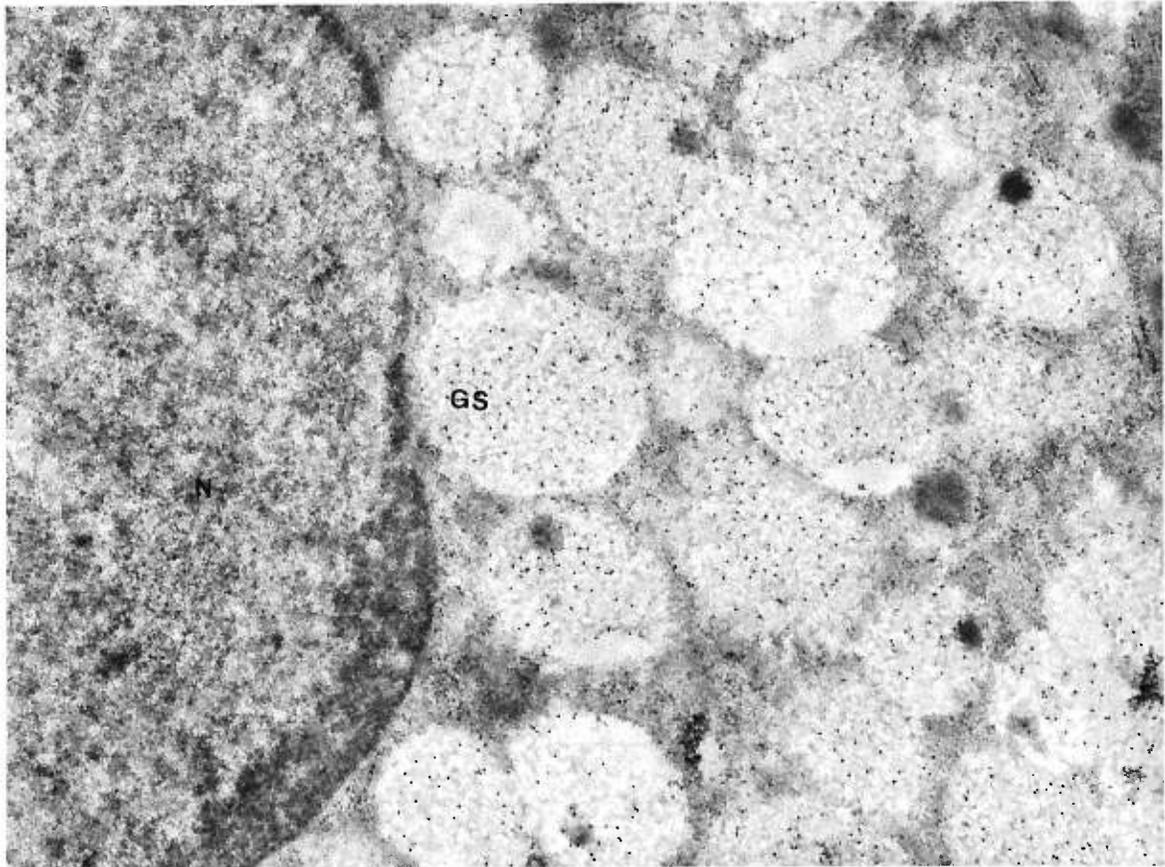
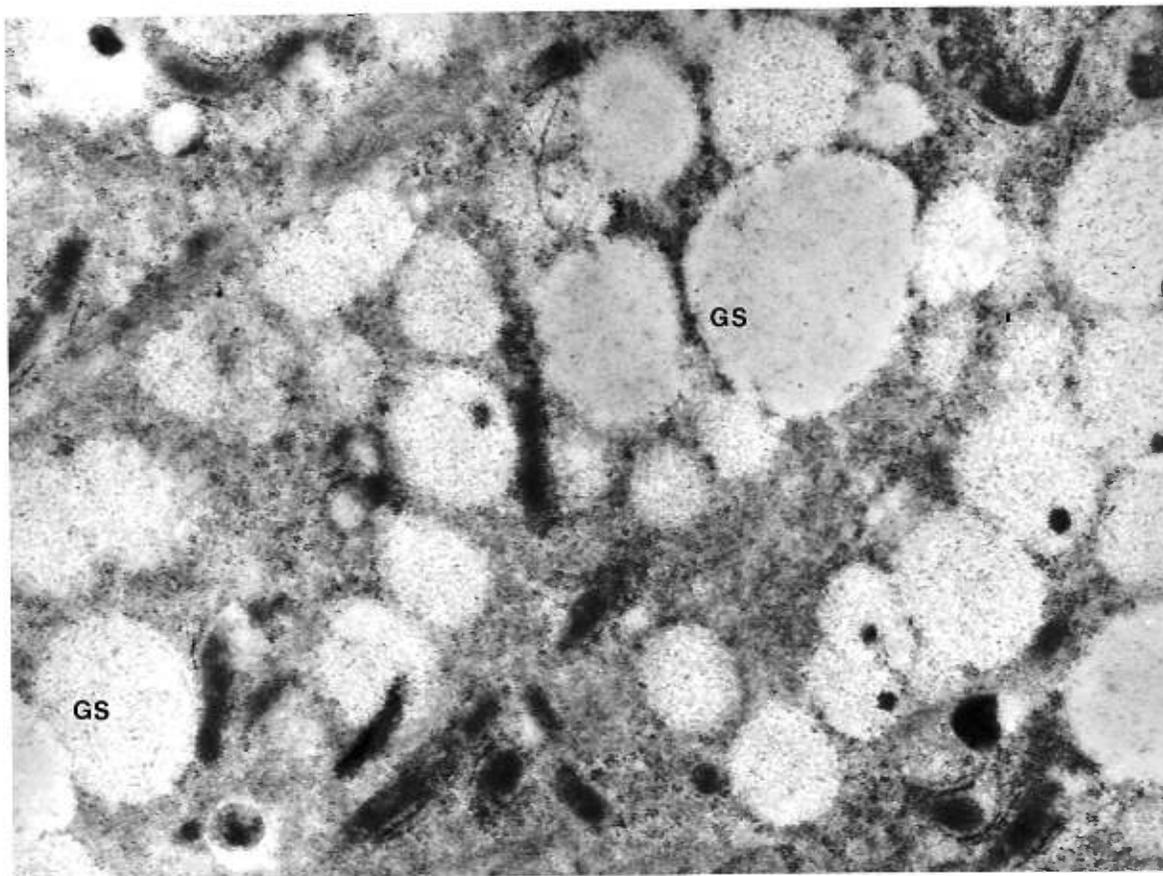


Fig. 11: Immunodétection d'oviductine sur coupes d'oviductes par immunocytochimie.

- A) Immunolocalisation de l'oviductine mature dans les granules de sécrétions des cellules sécrétrices de l'épithélium de l'oviducte à l'aide des anticorps polyclonaux anti-rhaOvim purifiés par affinité (dil.1/3). La réaction a été révélée grâce à la protéine A-or colloïdal en microscopie électronique.
N=noyau. GS=granule de sécrétion.



B) Témoin. Sérum préimmun purifié par chromatographie sur protéine A (dil.1/3).

4.3.4 Immunodétection d'oviductine sur des embryons 8-cellules

Les anticorps purifiés anti-rhaOvim, dirigés contre la structure polypeptidique de l'oviductine, détectent l'oviductine localisée au niveau d'embryons tubaires au stade 8-cellules. En effet, une forte réaction en immunofluorescence indirecte a été observée au niveau de la zp des embryons 8-cellules (Fig. 12a). La fluorescence est très intense et distribuée uniformément sur toute la surface de l'embryon. Contrastant avec ce résultat, la fraction IgG du sérum préimmun a donné un signal non différent du bruit de fond (Fig. 12b).

A)

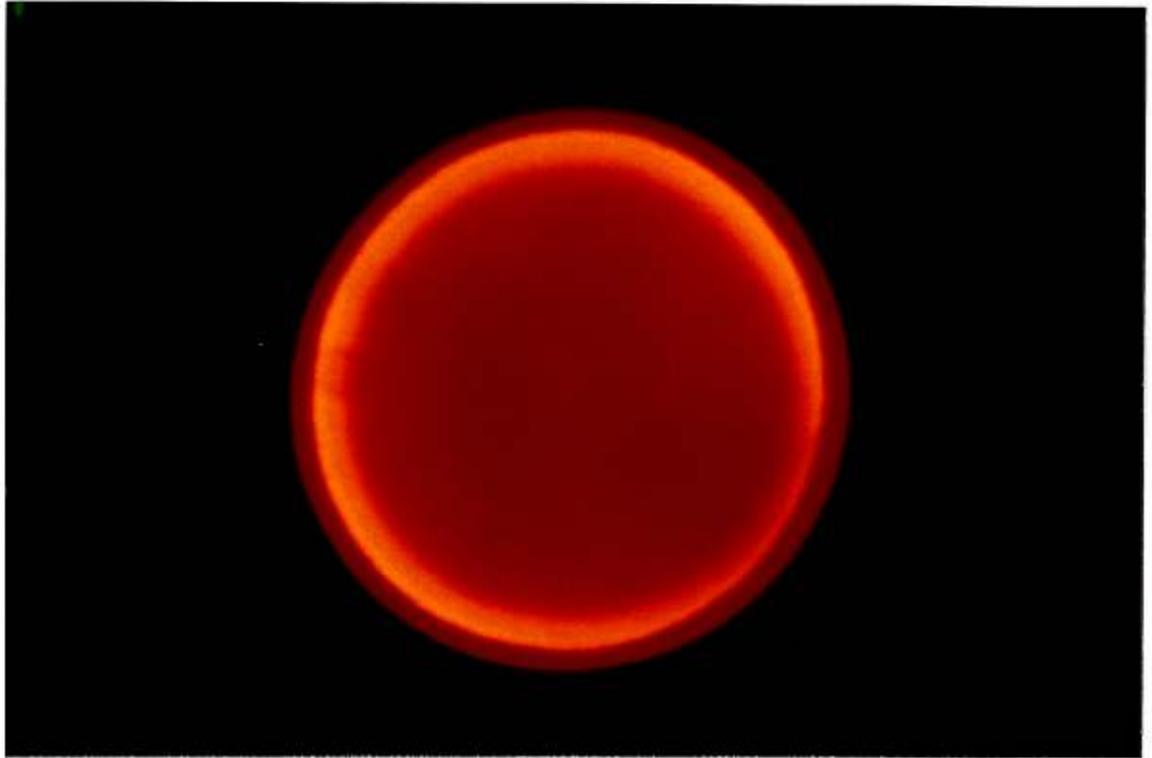


Fig. 12: Immunodétection d'oviductine par immunofluorescence indirecte sur des embryons 8-cellules.

Immunofluorescence indirecte obtenue sur un embryon 8-cellules exposé aux anticorps polyclonaux anti-rhaOvim purifiés par affinité (photo A) ou à la fraction IgG du sérum préimmun purifié sur chromatographie sur protéine A et servant de témoin (photo B). La photo C correspond au témoin observé en contraste de phase. Les embryons sont observés à un grossissement de 40X.

B)



C)



4.4 Développement embryonnaire bovin

4.4.1 Effet de rhaOvim sur le développement embryonnaire bovin.

L'effet de l'oviductine recombinante partielle sur le développement embryonnaire bovin a été mesuré à différentes concentrations. Tel que présenté au tableau I, la concentration de la protéine rhaOvim la plus élevée (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a produit un effet inhibiteur marqué. En effet, le pourcentage de blastocystes au jour 7 est de 4,7% dans le cas où la protéine rhaOvim est ajoutée comparativement à la valeur du témoin, 43%, qui est nettement plus élevée. Il est important de noter que ces pourcentages d'embryons au stade blastocyste ont été calculés en divisant le nombre de blastocystes au jour 7 par le nombre d'embryons ayant complété une première division cellulaire dans les 48 h suivant la fécondation. A une concentration de 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ nous avons également observé une diminution du nombre d'embryons atteignant le stade blastocyste, soit 28% au jour 7. Les deux autres concentrations (0,001 et 0,0001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) donnent respectivement 59 et 50% de développement au stade blastocyste ce qui se rapproche de la valeur du témoin (43%). Nous avons donc observé un effet dose-dépendant. Les embryons subissant l'effet de rhaOvim sont demeurés au stade 4- ou 8-cellules. Afin d'éliminer la possibilité qu'un contaminant bactérien soit à l'origine de cet effet, un témoin préparé à partir des bactéries utilisées pour l'expression de rhaOvim mais non-transformées avec le clone haOvim a été utilisé (voir Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus ne démontrent aucun effet de ce témoin sur le développement embryonnaire bovin. En effet le pourcentage de blastocystes au jour-7 est de 38% comparativement à 36% pour le témoin constitué du milieu de développement embryonnaire seul.

Tableau I: Effet d'une oviductine recombinante partielle de hamster (rhaOvim) sur le développement embryonnaire bovin.

Groupe	goutte	nbre ovocytes	clivage ¹	blastocyste (J7)	blasto/clivé (%)
Témoin	1	12	10	5	
B2	2	12	9	4	
	3	12	8	5	
	4	12	9	4	
	5	12	11	4	
	6	12	11	3	
Total		72	58	25	43,1
B2+	1	12	7	0	
rhaOvim 0,05 µg/µL	2	12	8	0	
	3	12	6	1	
Total		36	21	1	4,8
B2+	1	12	8	3	
rhaOvim 0,01 µg/µL	2	12	8	3	
	3	12	9	1	
Total		36	25	7	28,0
B2+	1	12	10	6	
rhaOvim 0,001 µg/µL	2	12	8	5	
	3	12	9	5	
Total		36	27	16	59,0
B2+	1	12	8	4	
rhaOvim 0,0001 µg/µL	2	12	8	3	
	3	12	6	4	
Total		36	22	11	50
B2 Témoin	1	12	6	4	
0,01 µg/µL	2	11	11	4	
	3	12	9	2	
Total		35	26	10	38,5
Témoin	1	12	10	4	
B2	2	12	9	2	
	3	12	6	3	
Total		36	25	9	36,0

¹embryons ayant subi une première division cellulaire 48 h post-fécondation.

4.4.2 Augmentation de la solubilité de rhaOvim.

Les deux oviductines recombinantes partielles produites ont été exprimées à partir du même clone, pQE-32-haOvim, seuls leurs protocoles de purification diffèrent (Fig. 13a et b). Ces deux protocoles ont été mis au point afin d'augmenter la solubilité des protéines recombinantes, l'étape critique étant celle de la renaturation sur colonne. Le premier protocole incluait une étape où un tampon phosphate servait à éliminer les conditions dénaturantes. Le deuxième implique également une étape similaire cette fois en utilisant un tampon Tris-HCl. Les résultats présentés à la Fig. 14a montrent que la solubilité de rhaOvim purifiée selon le premier protocole de purification est très faible à pH 7,5 bien que sa solubilité est grandement améliorée à pH 10,5. Notons ici que la solubilité est définie comme la propriété des protéines recombinantes à passer au travers d'une membrane de 0,22 μm . Dans le deuxième protocole de purification, la protéine rhaOvim* est aussi soluble que la première rhaOvim à pH 10,5 mais beaucoup plus soluble à pH 7,5 (Fig. 14b).

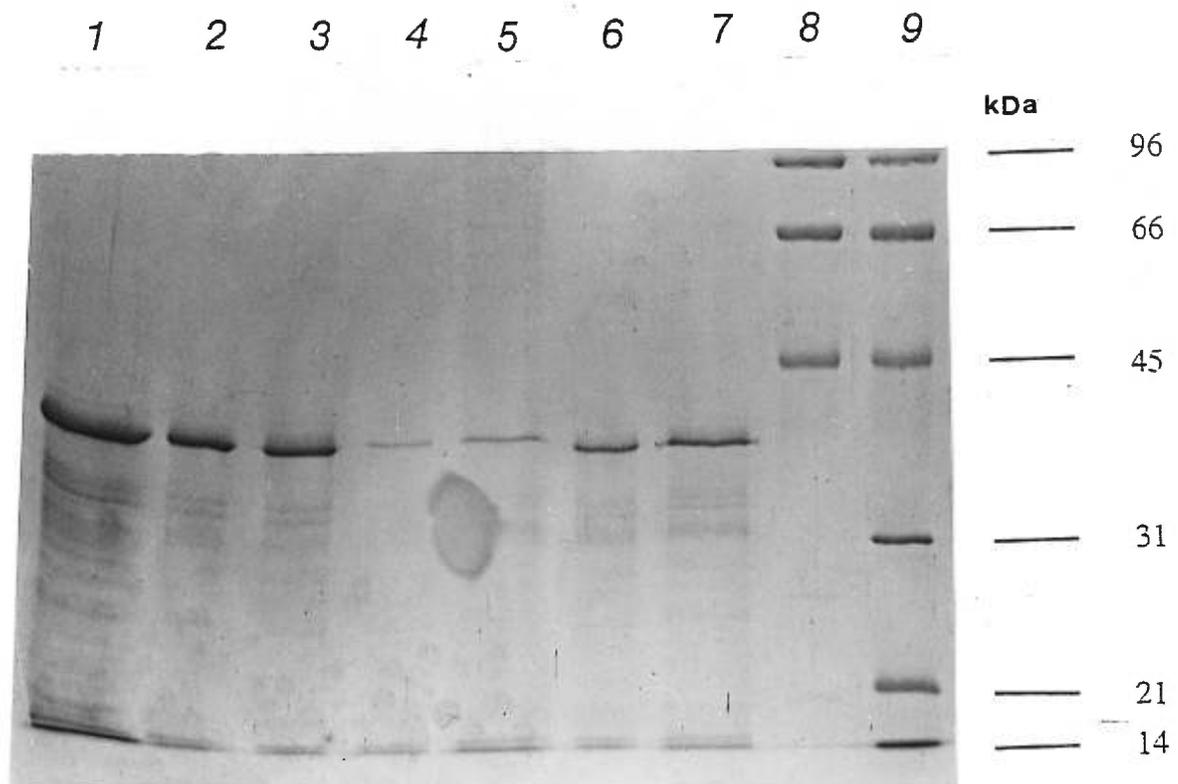
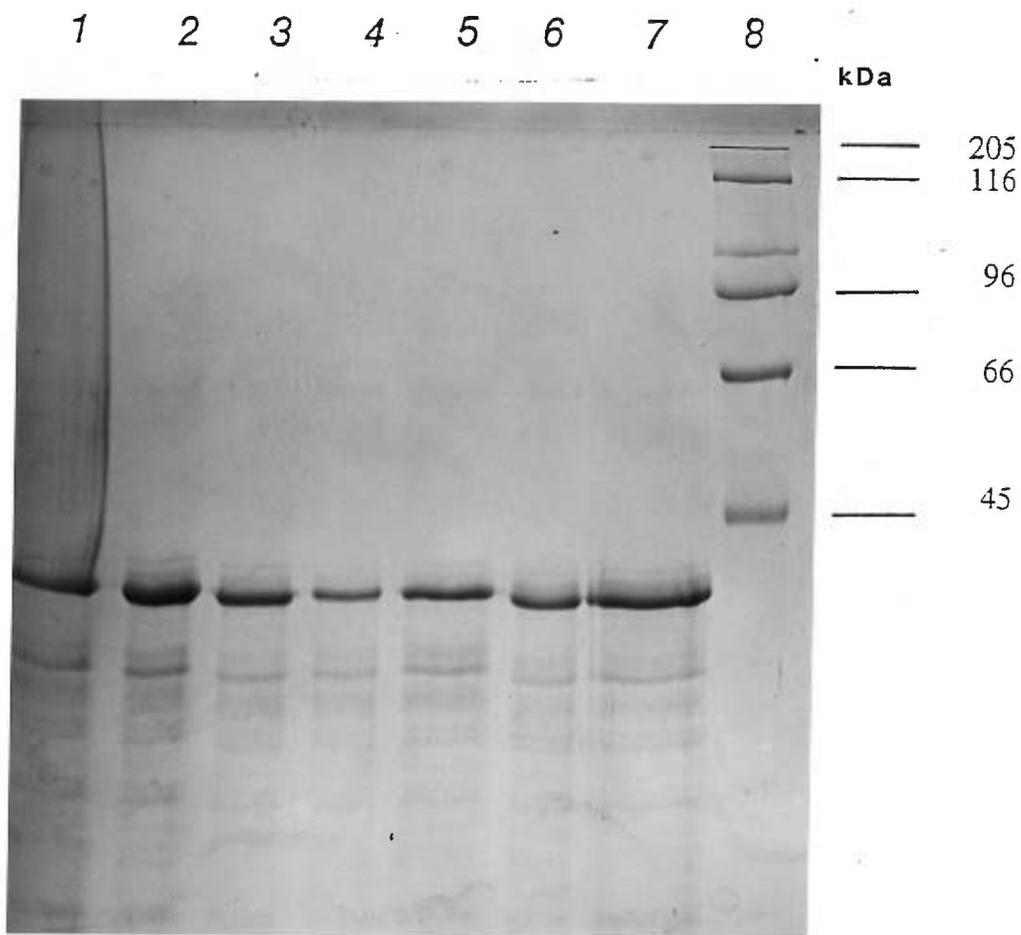


Fig. 14. Solubilité de rhaOvim et rhaOvim* selon deux différents protocoles de purification-renaturation.

A) Solubilité de rhaOvim. Puits 1: rhaOvim (5 μg) avant traitement. Puits 2: rhaOvim (5 μg) après filtration sur nanosep 10 K et dissolution dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,5. Puits 3: rhaOvim (5 μg) après filtration sur nanosep 10 K et dissolution dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 10,5. Puits 4 et 5: rhaOvim après filtration sur membrane de 0,22 μm (5 et 10 μg). Puits 6 et 7: rhaOvim après filtration sur membrane de 0,22 μm (5 et 10 μg). Puits 8 et 9: marqueurs de poids moléculaire.



B) Solubilité de rhaOvim*. Puits 1: rhaOvim* (5 µg) avant traitement. Puits 2: rhaOvim* (5 µg) après filtration sur nanosep 10 K et dissolution dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,5. Puits 3: rhaOvim* (5 µg) après filtration sur nanosep 10 K et dissolution dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 10,5. Puits 4 et 5: rhaOvim* après filtration sur membrane 0,22 µm (5 et 10 µg). Puits 6 et 7: rhaOvim* après filtration sur membrane 0,22 µm (5 et 10 µg). Puits 8: marqueurs de poids moléculaire.

5. DISCUSSION

Malgré la multitude de travaux consacrés à l'oviductine, toutes espèces confondues, son rôle biologique demeure énigmatique. Il semble probable que l'oviductine puisse favoriser la liaison des spermatozoïdes à la zp de l'ovocyte et même contribuer à la réaction acrosomique. Cependant les excellents résultats obtenus en fécondation *in vitro* chez l'humain, en absence d'oviductine, démontrent clairement qu'elle ne joue pas un rôle essentiel. L'implication de l'oviductine dans le processus de l'implantation utérine est également à rejeter car elle est complètement absente de l'embryon à ce stade du développement. Quant à son effet sur le développement embryonnaire, toutes les études suggèrent un effet bénéfique. On doit cependant admettre que toutes ces études ont été réalisées à l'aide de cellules d'oviducte, de milieux conditionnés ou d'oviductes en culture; l'établissement d'un lien direct avec l'oviductine n'a jamais été démontré en utilisant la protéine purifiée.

Notre hypothèse quant au rôle biologique possible de l'oviductine implique un effet modulateur du développement précoce. Contrairement aux hypothèses antérieures nous proposons que l'oviductine aurait la capacité d'inhiber le développement embryonnaire: un mécanisme de régulation du développement qui préviendrait l'implantation de l'embryon au niveau tubaire, donc les grossesses ectopiques. Il a été démontré depuis longtemps qu'un élément inhibiteur du développement embryonnaire est présent au niveau tubaire sans que son identité n'est été jusqu'à ce jour révélé. L'oviductine pourrait accomplir ce rôle à deux niveaux. Premièrement, par un mécanisme de répulsion: la charge négative nette à la surface de l'embryon, due aux groupements sulfates et sialiques de l'oviductine associée à la zone pellucide, et celle de l'épithélium également due à l'oviductine qui s'y associe empêcherait l'attachement de l'embryon au niveau tubaire. Une deuxième possibilité,

comme nous l'avons suggérée serait que l'oviductine internalisée inhiberait le développement de l'embryon et empêcherait donc celui-ci d'atteindre son stade implantatoire alors qu'il est toujours localisé au niveau tubaire.

Afin de vérifier notre hypothèse nous devions disposer d'une quantité suffisante d'oviductine. Ceci permettrait de tester son effet sur le développement embryonnaire *in vitro* et aussi de produire des anticorps polyclonaux contre la portion peptidique de l'oviductine afin d'étudier son métabolisme par l'embryon. Une oviductine recombinante partielle fut donc produite dans un système bactérien. Initialement, la production d'une oviductine recombinante complète était prévue mais celle-ci fut impossible à produire. En effet, autant avec la séquence d'oviductine de chat que de hamster, la seule alternative à la production d'une oviductine recombinante fut l'expression d'une séquence partielle où la portion chitinase fut tronquée. Il est intéressant de noter que chez certaines plantes, la chitinase, malgré l'absence de chitin, est produite en tant qu'agent de défense lors d'invasion par un élément pathogène. Nous avons donc émis l'hypothèse que la portion chitinase exprimée pouvait être toxique à la bactérie. L'expression bactérienne de la protéine rhaOvim avec purification par chromatographie d'affinité s'est avérée très efficace. L'expression bactérienne a l'avantage d'être hautement reproductible puisqu'environ 1 mg de la protéine rhaOvim par litre de milieu de culture a été obtenu à plusieurs reprises. La purification basée sur l'affinité de la résine de nickel pour la séquence de 6 histidines a permis d'obtenir une protéine rhaOvim dépourvue de contaminants tel que démontré à la Fig. 4.

Certains produits de plus faibles Mr persistent dans la préparation de la protéine rhaOvim purifiée. Ceux-ci peuvent correspondre à des produits de dégradation de la protéine recombinante car les anticorps polyclonaux produits contre

la protéine rhaOvim (bande à 43 kDa) détectent également les produits de plus faibles Mr. Ces produits pourraient également représenter des protéines rhaOvim tronquées produites par la terminaison prématurée de la traduction. Ce phénomène est habituellement présent lors de la production de longues protéines recombinantes ou lors de l'expression chez *E. coli* d'une protéine recombinante contenant des codons rarement utilisés (Grosjean et Fiers, 1982). L'identité de rhaOvim a été confirmée par microséquençage.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'oviductine est internalisée par l'embryon à compter du stade 2-cellules. Cette observation fut effectuée à l'aide d'un anticorps monoclonal, AcM 4.12, reconnaissant un épitope glycosidique. Puisque l'oviductine internalisée se retrouve dans les voies de dégradation endocytiques-lysosomales, sa structure glycosidique doit probablement être modifiée par les glycosidases ci-trouvant. Afin de poursuivre l'étude de l'oviductine internalisée, nous devons posséder un anticorps reconnaissant une oviductine modifiée. Nous avons donc produit des anticorps contre la protéine rhaOvim puisque celle-ci diffère de l'oviductine sécrétée par sa nature non-glycosylée. Un titre élevé d'anticorps anti-rhaOvim (jusqu'à 1:100 000 sur transferts de type Western, Fig. 7) a été obtenu après 4 et 6 semaines suivant le début de l'immunisation. Des résultats similaires ont été obtenus en ELISA (Fig. 6) après 13 semaines d'immunisation. Les anticorps polyclonaux anti-rhaOvim produits ont pu être purifiés sur chromatographie de protéine A et par affinité et leur spécificité établie.

Le fait que les anticorps reconnaissent la protéine rhaOvim mais non le DHFR recombinant démontre qu'ils ne sont pas dirigés contre la séquence de 6 histidines mais bien contre la structure polypeptidique de la protéine rhaOvim. La réaction des anticorps avec l'oviductine mature purifiée sur agarose couplé à des agglutinines

d'*Helix pomatia* a également été analysée par immunodétection sur transferts de type Western. À notre surprise, les anticorps anti-rhaOvim n'ont pas révélé l'oviductine mature (Fig. 9). Nous remarquons également une absence de réaction avec les protéines d'homogénats d'ovaires et d'utérus que nous ne pouvons associer à une spécificité tissulaire de part l'absence de résultat avec l'oviductine mature purifiée (Fig. 10). Ce résultat n'implique pas nécessairement que les anticorps anti-rhaOvim ne reconnaissent pas l'oviductine mature. En effet, en immunocytochimie sur coupes d'oviductes, l'oviductine localisée au niveau des granules de sécrétions des cellules sécrétrices de l'épithélium tubaire est révélée (Fig. 12a). L'ovaire utilisé comme témoin n'a montré aucun marquage (résultats non-publiés). Plusieurs facteurs doivent être considéré afin de tenter d'expliquer cette différence au niveau de l'immunoréactivité des anticorps anti-rhaOvim. Il est possible que les anticorps montrent une plus grande affinité en immunodétection sur coupes de tissus qu'en immunodétection sur transferts de type Western. De plus, les sites de fixation de l'anticorps peuvent également être inaccessibles par la méthode d'immunodétection sur transferts de type Western blot vue la liaison de la protéine au support. Fait intéressant, nous avons remarqué que l'oviductine mature sécrétée et associée à l'épithélium tubaire, plus précisément à la surface des cils des cellules ciliées, n'est pas révélée par les anticorps anti-rhaOvim, alors que l'AcM 4.12 donne une réaction positive (résultats non-publiés). Dans ce cas, l'absence de détection pourrait également résulter de l'association de l'oviductine à l'épithélium tubaire, ce qui masquerait les sites de liaison des anticorps à l'antigène. Enfin, la dilution de l'anticorps selon les techniques ainsi que la quantité de protéines utilisée lors de l'immunodétection sur transferts de type Western sont également des facteurs pouvant influencer l'immunoréactivité des anticorps anti-rhaOvim lors des différents expériences. Il est à noter que la détection avec l'AcM 4.12 sur transferts de type Western blot est également faible ce qui suggère que la quantité de protéine est

relativement faible. Finalement, la technique d'immunofluorescence indirecte a été appliquée à l'étude d'embryons au stade 8-cellules. La zp de ces embryons a montré une fluorescence très intense (Fig. 13a) alors que le témoin, incubé en présence d'IgG du sérum préimmum n'a montré aucune réaction. Ce résultat, conforme à ceux obtenus en immunocytochimie, suggère la capacité des anticorps anti-rhaOvim à reconnaître l'oviductine mature lors d'immunodétection histologique. Bien que la spécificité des anticorps anti-rhaOvim ait été difficile à déterminer par la technique d'immunodétection sur transferts de type Western blot, les résultats obtenus en immunocytochimie et immunofluorescence indirecte démontrent bien la spécificité des anticorps produits autant au niveau de la localisation tissulaire précise que l'absence de signal avec les témoins testés.

Les anticorps anti-rhaOvim, reconnaissant un épitope protéique, pourraient servir d'outils dans l'étude du métabolisme de l'oviductine par l'embryon. Ils permettront peut-être d'établir une relation entre le métabolisme de l'oviductine par l'embryon et notre hypothèse selon laquelle l'oviductine internalisée aurait un rôle inhibiteur au niveau du développement embryonnaire tubaire.

La production d'oviductine recombinante partielle nous a également permis de vérifier notre hypothèse d'un effet inhibiteur de l'oviductine sur le développement embryonnaire. La protéine rhaOvim produite correspond à la région mucine de l'oviductine de hamster puisque nous avons été dans l'impossibilité de produire la protéine recombinante complète. Cette malchance nous a permis tout de même d'étudier la portion mucine de l'oviductine. En effet, l'oviductine peut-être distinctement divisée en deux régions: la partie mucine et la partie chitinase (fig. 1). La portion non-exprimée correspond à la région contenant les séquences similaires aux chitinases. Cette similarité avec les chitinases pourrait permettre à l'oviductine de

s'associer à la zp tout comme la chitinase à la chitin. La région mucine serait davantage utile à la protection de l'embryon (Malette et coll., 1995). Puisque ces deux régions semblent jouer des rôles différents, il est intéressant de les étudier de façon distincte.

L'effet de la protéine rhaOvim sur le développement embryonnaire a été étudié chez le modèle bovin. Idéalement, cette étude aurait dû porter sur l'embryon de hamster. Toutefois, le développement embryonnaire *in vitro* chez cet animal est un processus qui se prête très mal à l'expérimentation surtout à cause du blocage du développement au stade 2-cellules (Bavister and coll., 1991). Même si ce blocage a pu être surmonté, le développement embryonnaire *in vitro* chez le hamster reste précaire. Nous avons établi une collaboration avec une compagnie (Alliance Boviteq), spécialisée dans la production d'embryons bovins. Les oviductines chez le bovin et le hamster étant assez bien conservées, ce modèle s'en trouve justifié (Fig. 1).

L'effet observé lors de la culture d'embryons bovins en présence ou en absence de la protéine rhaOvim, supporte notre hypothèse. La protéine rhaOvim a inhibé le développement et ce à un stade tardif seulement, c'est à dire au jour-7 (post-fécondation) correspondant au stade blastocyste. Comme on peut le constater au tableau I, l'effet inhibiteur de la protéine rhaOvim semble dose-dépendant, et la grande majorité des embryons sont arrêtés aux stades 4- ou 8-cellules. L'extrait témoin de bactéries M15 non-transformées (purifié selon le même protocole que la protéine rhaOvim) n'a démontré aucun signe d'inhibition du développement embryonnaire, on peut donc conclure que l'effet observé n'est pas dû à un contaminant d'origine bactérienne purifié en même temps que rhaOvim. Nous pouvons également affirmer que l'effet observé n'est pas dû à une interaction entre la protéine rhaOvim et

l'oviductine endogène, ce qui aurait pu masquer l'action biologique de celle-ci. En effet, aucune publication n'a rapporté la synthèse de protéines spécifiques à l'oviducte par des cellules tubaires en culture. De plus, les ovocytes utilisés lors de la fécondation *in vitro* sont de type ovarien, ceux-ci ont été maturés *in vitro* donc en absence de fluide tubaire et par conséquent d'oviductine. Il est important de souligner que les résultats ont été obtenus lors d'une expérience réalisée en triplicata, il s'agit donc de résultats préliminaires demandant confirmation. Ces résultats vont cependant dans le même sens que ceux obtenus avec le peptide P-563 (voir objectif de recherche) où un effet inhibiteur avait également été observé au stade blastocyste. Malgré leur nature préliminaire, ces résultats suscitent une réflexion que nous espérons fertile pour les temps futurs.

Dans les conditions *in vitro*, nos résultats nous suggèrent que l'embryon débute son développement de façon normale sans être influencé par la protéine rhaOvim, ce qui est logique puisque l'embryon n'internalise l'oviductine *in vivo* qu'à compter du stade 2-cellules. Une fois internalisée *in vivo*, l'oviductine serait par la suite modifiée dans les voies de dégradation endocytaire-lysosomale avant de produire son effet inhibiteur. Notre observation d'une inhibition tardive du développement embryonnaire par la protéine rhaOvim concorde bien avec le rôle proposé pour l'oviductine où l'importance de l'inhibition se situe au niveau des dernières étapes du développement tubaire, c'est à dire avant l'atteinte du stade implantatoire. Nos résultats indiquent également que la partie mucine est une partie active de l'oviductine quant à l'effet sur le développement embryonnaire. De plus, observer un effet inhibiteur en utilisant une oviductine partielle non-glycosylée, atteste de l'importance du métabolisme de l'oviductine internalisée par l'embryon. L'internalisation de l'oviductine ne serait pas un simple processus d'élimination protéique mais plutôt un procédé permettant de modifier la structure de l'oviductine.

Ces modifications, probablement effectuées par des glycosidases, permettraient de dévoiler la structure polypeptidique alors que de nouveaux peptides actifs pourraient résulter de la protéolyse de l'oviductine. Des glycosidases, pouvant influencer l'oviductine, proviendraient soit du contenu des granules corticaux libéré lors de la fécondation, soit de la voie de dégradation endocytaire-lysosomale ou du fluide tubaire (Tulsiani et al., 1996). Finalement, nos résultats semblent suggérer que la séquence N-terminale contenant les séquences similaires aux chitinases ne serait pas essentielle à l'effet inhibiteur puisque la portion de l'oviductine testée ne comprend que la partie mucine. Cependant nous ne pouvons affirmer que cette séquence est complètement inutile au niveau du rôle inhibiteur puisqu'un effet similaire fut obtenu à l'aide d'un peptide synthétique localisé dans la partie N-terminale (voir Objectif de recherche). Afin d'expliquer ces résultats contradictoires, l'oviductine pourrait être considérée comme une protéine multifonctionnelle. Les sucres contenus dans la partie chitinases permettraient à l'oviductine de se lier à la zp de l'ovocyte/embryon. L'oviductine associée à la zp pourrait protéger l'ovocyte/embryon grâce à sa caractéristique mucine. Une fois internalisée, l'oviductine métabolisée jouerait son rôle inhibiteur qui serait du autant à la séquence protéique correspondant à la portion chitinase que mucine. Cependant, afin de confirmer cette hypothèse, une oviductine recombinante non-glycosylée correspondant à la portion chitinase devrait être produite et testée sur le développement embryonnaire puis comparée aux résultats obtenus avec une oviductine recombinante non-glycosylée complète. Nous pourrions à ce moment, déterminer l'importance de ces deux portions de l'oviductine au niveau du rôle inhibiteur suggéré.

Les résultats obtenus lors de cet étude vont à l'encontre de tous les travaux concernant le ou les rôles possibles de l'oviductine au niveau du développement

embryonnaire bien que ceux-ci n'aient jamais démontré l'effet de l'oviductine purifiée. Nous sommes conscients qu'il ne s'agit que de résultats préliminaires donc qu'il y a place à l'interprétation. Il aurait été intéressant de démontrer clairement l'internalisation de la protéine rhaOvim par l'embryon afin de démontrer son éventuelle capacité à être métabolisée donc à influencer le développement embryonnaire. Malheureusement, le nombre d'embryons qui étaient mis à notre disposition étant restreint, nous n'avons pu étudier ce processus. Malgré cela, l'effet inhibiteur observé nous suggère indirectement que la protéine rhaOvim interagit d'une façon quelconque avec l'embryon puisque son développement embryonnaire en est affecté.

Bien que la notion d'internalisation de l'oviductine mature par l'embryon ait été démontré, la présence d'un récepteur demeure spéculatif. Si un tel récepteur existe, certaines hypothèses pourraient être émises en relation avec les résultats discutés ici. Nous pourrions supposer que la protéine rhaOvim liée au récepteur hypothétique de l'oviductine abolirait l'effet biologique vu sa nature "mutée". Ceci expliquerait la contradiction entre les effets bénéfiques rapportés dans la littérature et l'inhibition du développement embryonnaire observé lors de cet étude. Cependant nous devons préciser qu'il ne s'agit que de spéculations puisqu'aucun récepteur n'a été identifié jusqu'à aujourd'hui. Nous ne pouvons donc établir de relation entre le mécanisme d'inhibition et le fonctionnement d'un récepteur hypothétique vu le manque évident de données à ce sujet. Nous devons également exclure la notion de "dominant-négatif" où l'ajout d'une protéine mutée, par exemple, abolit et inhibe l'action biologique de la protéine endogène correspondante. Comme nous l'avons précisé précédemment, la présence d'oviductine mature n'a jamais été démontré au niveau de cellules tubaires en culture. Finalement, l'inhibition tardive du développement embryonnaire par la protéine rhaOvim laisse croire qu'il s'agit d'une

régulation précise du développement embryonnaire suite au métabolisme de l'oviductine. En effet, l'effet observé est présent à un moment précis du développement embryonnaire, quelques jours suivant l'ajout de la protéine rhaOvim au milieu de culture.

Lors de la préparation de rhaOvim pour l'étude de son effet sur le développement bovin, nous avons remarqué sa très faible solubilité dans le milieu de développement Ménézo B2 à pH 7,4. Ce problème est souvent rencontré lors de la production d'une protéine recombinante chez les procaryotes (Schein, 1989), surtout à cause de leur fréquente localisation au niveau des corps d'inclusion. La majorité des étapes du protocole de purification se déroulaient en conditions dénaturantes, la dernière étape permettant d'éliminer celles-ci à l'aide d'un tampon phosphate. Nous pouvons émettre l'hypothèse que rhaOvim inadéquatement repliée lors de l'élution aura tendance à former des agrégats avec elle-même. Les charges positives, négatives et groupements hydrophobes étant incorrectement positionnés, ceux-ci pourront interagir et rendre rhaOvim insoluble. Nous avons donc tenté d'augmenter la solubilité de rhaOvim en modifiant le protocole purification. Le protocole utilisé est une adaptation de la méthode de purification de Holzinger et coll. (1996). Il permet d'éliminer rapidement les conditions dénaturantes, une condition plus compatible avec un repliement adéquat (Fig. 14). Le tampon de renaturation a également été changé pour un tampon NaH_2PO_4 0,1 M. Comme nous pouvons le remarquer à la Fig. 15a, la rhaOvim est soluble à pH 10,5 mais presque complètement insoluble au pH du milieu de développement embryonnaire (pH 7,4). Avec le protocole de purification modifié, rhaOvim* est maintenant soluble autant à pH 10,5 qu'à pH 7,4.

Même si nous avons réussi à augmenter la solubilité de rhaOvim, il nous est impossible de déterminer laquelle des deux protéines recombinantes ressemble davantage à l'oviductine mature. Evidemment, les oviductines recombinantes que nous avons produites sont à la base très différentes de l'oviductine mature de par l'absence de glycosylation et la séquence partielle exprimée. De plus, puisque le rôle de l'oviductine demeure inconnu, nous ne pouvons comparer les activités des oviductines recombinantes dans un système connu. Donc nous ne pouvons pas conclure que rhaOvim* de par sa solubilité accrue est biologiquement plus active que rhaOvim. Il s'agira donc d'étudier l'effet de rhaOvim* sur le développement embryonnaire bovin et d'observer la présence d'un effet comparable ou différent de celui de rhaOvim.

6. Conclusion

Bien que le rôle de l'oviductine demeure inconnu, nos résultats suggèrent un effet au niveau du développement embryonnaire tubaire. L'oviductine internalisée permettrait un contrôle de la vitesse de développement de l'embryon. Ces résultats, bien que préliminaires, viennent corroborer ceux obtenus avec un peptide synthétique. Les résultats présentés étendent à 255 acides aminés la portion de l'oviductine non-glycosylée testée. La prochaine étape sera de tester la protéine complète purifiée ou produite à partir d'un système d'expression eucaryotique ou procaryotique. L'anticorps anti-rhaOvim permettra de confirmer d'un point de vue histologique l'hypothèse selon laquelle l'oviductine recombinante est effectivement internalisée et que celle-ci aurait un effet sur le développement embryonnaire tubaire.

7. BIBLIOGRAPHIE

- Adams, C.E. (1958). Egg development in the rabbit : The influence of postcoital ligation of the uterine tube, and ovariectomy. *J. Endocrinol.*, 16, 283.
- Afzelius, B.A., Cammer, P., Mossberg, B. (1978). On the function of cilia in the female reproductive tract. *Fertil. Steril.*, 29, 72-74.
- Aunomas, S., Mayumi, T., Susuki, K., Noguchi, T., Iwai, M., Okabe, M. (1973). Studies on sperm capacitation. The relationship between a given sperm-coating antigen and a sperm capacitation phenomenon. *J. Reprod. Fertil.*, 35, 425-431.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1996). In "Current protocols in molecular biology." Vol. 1, 1.8.2-1.8.3.
- Barnett, D.K., Bavister, B.D. (1992). Hypotaurine requirement for in vitro development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocyst and production of term offspring from in vitro-fertilized ova. *Biol. Reprod.*, 47, 297-304.
- Bendayan, M. (1984). Protein A-gold electron microscope immunocytochemistry: methods, applications and limitations. *J. Electron. Microsc. Tech.*, 1, 243-270.
- Bavister, B.D. (1987). Studies on the development blocks in cultured hamster embryos. In: Bavister B.D. (ed). *The Mammalian preimplantation embryo*. New York: Plenum Publishers, 219-249.
- Bedford, J.M., Chang, M.C. (1962). Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high speed centrifugation. *Am. J. Physiol.*, 202, 179-181.
- Boatman, D.E. (1994a). Modulation of spermatozoa and zona pellucida properties by the soluble acrosome reaction-inducing factor in the ovulated egg-cumulus complex. *Mol. Reprod.*, 38, 410-420.
- Boatman, D.E., Magnoni, G.E. (1994b). Identification of the sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. *Biol. Reprod.*, 50 (Suppl 1), 129.
- Boice, M.L., McCarthy, T.J., Mavrogianis, P.A., Fazleabas, A.T., Verhage, H.G. (1990) 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.

- Broermann, D.M., Xie, S., Nephew, K.P., Pope, W.F. (1989). Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucida. *J. Anim. Sci.*, 67, 1324-1329.
- Buhi, W.C., Bazer, F.W., Alvarez, I.M., Mirando, M.A. (1991). *In vitro* synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 β -estradiol-treated ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 128, 3086-3095.
- Buhi, W.C., Ashworth, C.J., Bazer F.W., Alvarez, I.M. (1992). *In vitro* synthesis of oviductal secretory proteins by estrogen-treated ovariectomized gilts. *J. Exp. Zool.*, 262, 426-435.
- Buhi, W.C., O'Brien, B., Alvarez, I.M., 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, W.C., Alvarez, I.M., Choi, I., Simmen, F.A. (1994). A recombinant cDNA to a porcine oviductal estrogen-dependent secretory glycoprotein (POESP). *Biol. Reprod.*, 50 (Suppl 1), 165.
- Carney, E.W., Tobback, C., Foote, R.H. (1990). Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 26, 629-635.
- DeSouza, M.M., Murray, M.K. (1994). An mRNA encoding an estrogen(E)-dependent oviduct-specific glycoprotein (Mr 90-92,000) is expressed in a temporal and regional specific manner during early pregnancy in the sheep. *Biol. Reprod.*, 50 (Suppl 1), 96.
- Donnelly, K.M., Fazleabas, A.T., Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A., Jaffe, R.C. (1991). Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Mol. Endocrinol.*, 5, 356-364.
- Fadel, H.E., Berns, D., Zaneveld, L.J.K., Wilbanks, G.D., Brueschke, E.E. (1976). The human uterotubal junction: a scanning electron microscope study during different phases of the menstrual cycle. *Fertil. Steril.*, 27, 1176-1186.
- Fox, L., Shrivvers, C.A. (1975). Immunologic evidence for addition of oviductal components to the hamster zona pellucida. *Fertil. Steril.*, 26, 599-608.
- Fraser, L.R., (1990). Adenosine and its analogues, possibly acting at A₂ receptors, stimulate mouse sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. *J. Reprod. Fertil.*, 89, 463-476.

- Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Richardson, L., Brown, C.R., Moor, R.M. (1989). Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cell and their function in embryonic development. *Development*, 106, 303-312.
- Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Richardson, L., Brown, C.R., Moor, R.M. (1991). Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur. J. Bas. Appl. Histochem.*, 35, 383-392.
- Green, C.M., Cockle, S.M., Watson, P.F., Fraser, L.R. (1994). Stimulating effect of pyroglutamylglutamylprolineamide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 38, 215-221.
- Green, C.M., Cockle, S.M., Fraser, L.R., Watson, P.F., (1996a). The effect of FPP on the motile characteristics of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Abstr. Ser.*, 17, 31.
- Green, C.M., Cockle, S.M., Watson, P.F., Fraser, L.R. (1996b). Fertilization promoting peptide, a TRH-like peptide, stimulates capacitation and fertilizing ability of human spermatozoa *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 11, 830-836.
- Grosjean, H., Fiers, W. (1982). Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene*, 18, 199-209.
- Gutiérrez, A., Garde, J., Garcia-Artiga, C., Vazquez, I. (1993). Ram spermatozoa co-culture with epithelial cell monolayers: An *in vitro* model for the study of capacitation and the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, 36,338-345.
- Hartmann, J.F., Gwatkin, R.B.L. (1971). Alteration of sites on the mammalian sperm following capacitation. *Nature*, 234, 479-482.
- Holzinger, A., Phillips, K.S., Weaver, T.E. (1996). Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. *Biotechniques*, 20, 804-806, 808.
- Hunter, R.H.F., Nichol, R. (1988). Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res.*, 21, 255-266.
- Jaffe, R.C., Arias, E.B., O'Day-Bowman, M.B., Donnelly, K.M., Mavrogianis, P.A., Verhage, H.G. (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.

- Kan, F.W.K., St-Jacques, S., Bleau, G. (1989). Immunocytochemical evidence for the transfer of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biol. Reprod.*, 40, 585-598.
- Kan, F.W.K., 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.
- Kapur, R.P., Johnson, L.V. (1985). An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryo. *Dev. Biol.*, 112, 89-93.
- Kapur, R.P., Johnson, L.V. (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.
- Léveillé, M.C., Roberts, K.D., Chevalier, S., Bleau, G. (1987). Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.*, 36, 227-238.
- Leese, H.J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 82, 843-856.
- Macart, M., Gerbault, L. (1982). An improvement of the coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins: application to cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta.*, 122, 93-101.
- Malayer, J.R., Hansen, P.J., Buhi, W.C. (1988). Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J. Exp. Zool.*, 218, 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., Fillion, B., St-Jacques, S., Kan, F.W.K., Bleau, G. (1995a). The 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 oviductine: identification of the polypeptide precursors and characterization of the 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. *Molec. Reprod. Dev.*, 41, 384-

397.

- Ménézo, Y., Hamidi, J., Khatchadourian, Ch., Nardon, C. (1989): The murine prepuberal oviduct supports early embryo development in vitro. *Dev. Growth Differ.*, 31, 557-561.
- Morrissey, J.H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, 117, 307-310.
- O'Day-Bowman, M.B., Mavrogianis, P.A., Reuter, L.M., Johnson, D.E., Fazleabas, A.T., Verhage, H.G. (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.
- Oliphant, G. (1976). Removal of sperm seminal plasma components as a prerequisite to induction of capacitation. *Fertil. Steril.*, 27, 28-33.
- Oliphant, G., Ross, P.R. (1982). Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from rabbit oviduct. *Biol. Reprod.*, 26, 537-543
- Oliphant, G., Reynolds, A.B., Smith, P.F., Ross, P.R. Marta, J.S. (1984). Immunocytochemical localization and determination of hormonal-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biol. Reprod.*, 31, 165-174.
- Paquette, Y., Merlen, Y., Malette, B., Bleau, G. (1995). Allelic polymorphism in the hamster oviductin gene is due to a variable number of mucin-like tandem repeats. *Molec. Reprod. Dev.*, 42(4), 388-396.
- Reddy, J.M., Stark, R.A., Zaneveld, J.D., (1980). A high molecular weight antifertility component in human seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.*, 60, 126-134.
- Robitaille, G., St-Jacques, S., Potier, M., Bleau, G. (1988). Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated oocyte. *Biol. Reprod.*, 38, 687-694.
- Roux, E., Bleau, G., Kan, F.W.K. (1994). Fate of hamster oviductin in oviduct and uterus during early gestation. *Biol. Reprod.*, 41, 523-532.
- 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.

- Sanger F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463-5467.
- Saxena, N.K., Russell, L.D., Saxena, N., Peterson, R.N. (1986). Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the mouse. *EMBO J.*, 2, 1451-1456.
- Schein, C.H. (1989). Production of soluble proteins in bacteria. *Biotechnology*, 7, 1141-1149.
- Shapiro, S.S., Brown, N.E., Yard, A.S. (1974). Isolation of an acidic glycoprotein from rabbit oviductal fluid and its association with the egg coating. *J. Reprod. Fertil.*, 40, 281-290.
- Strous, G.J., Dekker, J. (1992). Mucin-type glycoprotein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 27, 57-92.
- 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.
- Suarez, S.S. (1996). Hyperactivated motility in sperm. *J. Androl.*, 17, 331-335.
- Sutton, R., Nancarrow, C.D., Wallace, A.L.C. (1986). Oestrogen and seasonal effects on the reproduction of an estrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 72, 415-422.
- Tulsiani, D.R., Chayko, C.A., Orgebin-Crist, M.C., Araki, Y. (1996). Temporal surge of glycosyltransferase activities in the genital tract of the hamster during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 54, 1032-1037.
- Verhage, H.G., Fazleabas, A.T., Donnelly, K. (1988). The *in vitro* synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology*, 122, 1639-1645.
- Verhage, H.G., Boice, M.L., Mavrogianis, P., Donnelly, K., Fazleabas, A.T. (1989). Immunological characterization and immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the baboon (*Papio anubis*). *Endocrinology*, 124, 2464-2471.
- Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A., Boice, M.L., Li, W., Fazleabas, A.T. (1990). Oviductal epithelium of the baboon: Hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins. *Am. J. Anat.*, 187, 81-90.
- Yanagimachi, R (1988). Mammalian fertilization. Knobil, E, Neill, J.D. (éd.): "The physiology of reproduction." New York: Raven Press, pp. 135-185.

Yanagimachi, R (1994). Mammalian fertilization. Knobil, E, Neill, J.D. (éd.):
"The physiology of reproduction." New York: Raven Press, pp. 189-317.

Yang, C.H., Yanagimachi, R. (1989). Differences between mature ovarian and
oviductal oocytes: A study using the golden hamster. Hum. Reprod., 4,63-71.

ANNEXE 1

Composition du milieu TALP-2

CaCl ₂	1,80 mM
NaCl	124,80 mM
KCl	2,68 mM
MgCl ₂ .H ₂ O	0,49 mM
NaHCO ₃	11,90 mM
D-glucose	4,50 mM
Pen/Strep.	100,0 UI/mL
NaH ₂ PO ₄	0,36 mM
HEPES	5,00 mM

avant utilisation

pyruvate de sodium	0,09 mM
lactate de sodium	9,00 mM

Ajuster le pH à 7,2-7,4

ANNEXE 2

Composition du milieu HECM-2

<u>Produits</u>	<u>Concentration finale</u> (μ M)
PVA	0,1 mg/mL
NaCl	116,5
KCl	3,16
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	230,0
NaHCO ₃	25,0

Incubation sous 5% CO₂, 16 h.

avant utilisation	
lactate de sodium 60%	10,0
pyruvate de sodium	0,5
glutamine	1,0
isoleucine	0,2
phénylalanine	0,1
méthionine	0,05