

2m11.26.15.2

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Études de la structure et de l'expression
des acides nucléiques de
"Leukeamia Inhibitory Factor" bovin (bLIF)**

Par

Chantal Brisson

Faculté de Médecine Vétérinaire
Département de Biomédecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option reproduction

Avril 1998

© Chantal Brisson 1998



SF
607
454
1998
V.010

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Études de la structure et de l'expression
des acides nucléiques de
"Leukemia Inhibitory Factor" bovin (LIF)

Par

Christal Brisson

Département de Biomédecine vétérinaire
Faculté de Médecine Vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option reproduction

Avril 1998

© Christal Brisson 1998



UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

Ce mémoire intitulé:

**Études de la structure et de l'expression
des acides nucléiques de
"Leukeamia Inhibitory Factor" bovin (bLIF)**

Présenté par

Chantal Brisson

a été évalué par un jury composé
des personnes suivantes :

Dr Jacques G. Lussier :	Président du Jury
Dr David W. Silversides :	Directeur de recherche
Dr Alan K. Goff :	Codirecteur de recherche
Dr Daniel Martineau :	Membre du Jury

Mémoire accepté le 6 Avril 1998

SOMMAIRE

Mots clés: Bovin, implantation, LIF, lignées cellulaires immortalisées, hormones stéroïdiennes.

Chez les mammifères, la période de préimplantation et l'implantation sont des étapes importantes au cours desquelles l'embryon et l'utérus doivent se synchroniser pour permettre la continuation de la grossesse de façon adéquate. Il existe plusieurs molécules qui peuvent favoriser ces étapes du développement. La cytokine protéinique identifiée "leukemia inhibitory factor" (LIF) est un de ces facteurs. Différentes équipes ont travaillé sur la molécule pour en déterminer plusieurs rôles. Le rôle peut varier selon la cellule cible. Les différents rôles de la molécule ont permis d'attribuer plusieurs noms à la protéine LIF. La protéine agit sur un récepteur composé de deux sous-unités: la sous-unité α et la sous-unité β . De plus, le récepteur pour LIF est associé à la protéine gp130, qui est chargée de transmettre le signal.

Le moment où le taux d'expression de LIF est le plus élevé se situe généralement autour de la période d'implantation pour la plupart des espèces. Toutes espèces confondues, LIF est exprimé dans plusieurs tissus, mais les tissus reproducteurs exprimant LIF aux taux les plus élevés sont l'utérus, les cellules endométriales primaires, les cellules endométriales transformées. Chez d'autres espèces telle la souris, l'expression maximale survient non seulement au moment de l'implantation mais également au moment de l'ovulation. Des études d'inactivation du gène LIF ont été réalisées pour déterminer l'importance de la protéine au moment de l'implantation. Ces études ont permis de déterminer qu'en absence d'expression de LIF dans les cellules endométriales chez la mère, les embryons ne s'implantent pas. Toutefois, ces mêmes embryons s'implantent lorsqu'ils sont transférés dans une receveuse normale.

Différents facteurs peuvent influencer l'expression de LIF. Pour le système reproducteur, les hormones stéroïdiennes sont particulièrement intéressantes, puisque chez la souris et l'humain, la présence d'oestrogène stimule l'expression de LIF. Par contre, pour le lapin, l'oestrogène inhibe la transcription de LIF. Chez la souris, les cellules endométriales stromales n'expriment pas LIF par contre chez l'humain les cellules déciduales (d'origine stromales) expriment le transcrite de LIF.

Les objectifs de nos expériences furent de déterminer la séquence nucléotidique de LIF bovin et d'étudier la modulation de l'expression du gène LIF bovin par les hormones stéroïdiennes. Nous avons également évalué l'expression et l'importance du gène LIF dans le système reproducteur bovin.

Des études de clonage par PCR et de séquençage ont permis de déterminer la séquence d'acides désoxyribonucléiques complémentaire (ADNc) et de la partie 3' non-transcrite (UTR) du gène LIF bovin. La séquence obtenue est relativement similaire aux séquences connues. Nous avons entrepris l'étude d'expression de LIF sur plusieurs tissus en analysant l'ARN total par RT-PCR. Nos études ont permis de déterminer que LIF bovin était exprimé dans plusieurs tissus dont les lignées cellulaires endométriales bovines et les cellules endométriales primaires bovines. Nous avons également vérifié l'influence exercé par les hormones stéroïdiennes sur les cellules endométriales bovines au point de vue de l'expression de la protéine LIF bovin. Ces études ont été effectuées en exposant les cellules à l'étude aux différentes hormones stéroïdiennes pour une période déterminée. Par la suite, l'ARN total fut isolées des cellules et analysées par RT-PCR. Les études de RT-PCR ont permis de démontrer que la progestérone stimule l'expression de LIF. L'oestrogène pour sa part, inhibe l'induction provoqué par la progestérone. Une étude de la séquence nucléotidique a permis de déceler plusieurs sites potentiels pour les éléments de réponse aux hormones stéroïdiennes dans la partie 3' du gène ainsi que dans la partie 3'UTR.

Nous avons déterminé la séquence de l'ADNc de LIF bovin de même que la séquence de la partie 3' non codante qui n'était pas encore connue. De plus, l'influence de la progestérone et de l'oestrogène sur l'expression de LIF a été vérifiée sur les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre utérin (pour les cellules primaires et les cellules transformées). Ainsi, les objectifs à court terme ont été atteint. Toutefois, il serait utile de vérifier l'effet des hormones stéroïdiennes dans un contexte *in vivo*. Comme il a déjà été mentionné, l'effet des hormones stéroïdiennes sur LIF est également observé au même moment chez d'autres espèces. Il serait donc possible, que chez le bovin, LIF puisse avoir une implication au niveau de l'implantation. Toutefois, d'autres études *in vitro* ainsi que *in vivo* devront être exécutées pour réellement prouver une telle implication chez le bovin.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE	TITRE.....	i
	IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
	SOMMAIRE.....	iii
	TABLE DES MATIÈRES.....	v
	LISTE DES TABLAUX.....	x
	LISTE DES FIGURES.....	xi
	ABRÉVIATIONS.....	xii
	DÉDICACE.....	xvi
	REMERCIEMENTS.....	xvii
1.	INTRODUCTION.....	1
1.1	La communication entre l'utérus et l'embryon chez les mammifères	1
1.1.1	Les différents stades du développement embryonnaire précédent l'implantation.....	1
1.1.2	Les différentes étapes de l'implantation.....	3
1.1.3	La nutrition de l'embryon durant la période précédent l'implantation.....	4
1.1.4	Différents facteurs qui influencent le développement de l'embryon et de l'utérus.....	5
1.1.4.1	EGF.....	6
1.1.4.2	FGF.....	7
1.1.4.3	IL-1.....	7
1.1.4.4	CSF-1.....	7
1.1.4.5	LIF et son récepteur (rLIF).....	8
1.2	Historique et fonctions de la molécule LIF	9
1.3	Clonage de la molécule LIF	11
1.4	L'expression de LIF	12
1.4.1	La localisation spatiale de LIF.....	12
1.4.1.1	La localisation de l'ARNm dans les tissus reproducteurs.....	12
1.4.1.2	La localisation spatiale de la protéine LIF.....	13
1.4.2	La localisation temporelle de LIF.....	14
1.4.3	Les signaux protéiques influençant l'expression de LIF.....	15

1.4.4	Les hormones stéroïdiennes influencant l'expression de LIF.....	15
1.4.5	Les éléments de réponse aux hormones (HRE).....	17
1.5	Mode d'action de la molécule LIF.....	17
1.6	Études de transgénisme.....	18
1.6.1	Études d'inactivation de la protéine LIF	19
1.6.2	Études d'inactivation du récepteur LIF.....	19
1.6.3	La surexpression de LIF.....	20
1.7	Effet de LIF sur le développement de l'embryon.....	20
1.8	Objectifs de l'étude.....	22
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
2.1	Clonage de la séquence génomique du gène LIF bovin.....	23
2.1.1	L'isolation de l'ADN génomique.....	23
2.1.2	L'amplification du fragment bLIF à partir de l'ADN génomique..	23
2.1.2.1	L'amplification du fragment bLIF E-5.....	23
2.1.3	Analyse Southern de l'ADN génomique.....	25
2.1.4	La création d'une banque d'ADN génomique sélectionnée.....	25
2.1.5	L'amplification du gène LIF par PCR à partir de la banque d'ADN génomique sélectionnée.....	25
2.1.5.1	Le fragment bLIF H/T ₃	26
2.1.5.2	Le fragment bLIF L/11B.....	26
2.1.5.3	Le fragment bLIF Exp.A/7.....	27
2.1.6	L'étude de différents fragments provenant du PCR.....	27
2.1.7	Le clonage des fragments de PCR.....	28
2.1.7.1	Préparation du vecteur pGemT.....	28
2.1.7.2	Préparation du fragment.....	28
2.1.7.3	La ligation.....	28
2.1.7.4	La transformation et la sélection des clones avec le vecteur pGemT.....	29
2.1.7.5	La validation de l'insert par mini préparation de plasmide.....	29
2.1.7.6	Maxi-préparation de plasmide.....	30
2.1.8	Le séquençage des différents fragments obtenus.....	30
2.1.9	Amplification de l'extrémité 3' non codant de l'ADNc (RACE 3').....	31
2.1.10	Amplification de l'extrémité 5' du gène LIF.....	31
2.2	Clonage de la séquence exprimée de LIF bovin (ADNc).....	32

2.2.1	L'isolation de l'ARN utilisé pour le clonage.....	32
2.2.2	Le clonage dans le vecteur pCRII.....	32
2.2.2.1	La ligation.....	32
2.2.2.2	La transformation.....	33
2.2.3	Le séquençage.....	33
2.3	Création de lignées cellulaires endométriales bovines.....	33
2.3.1	Isolation de cellules endométriales épithéliales bovines	33
2.3.2	Culture des cellules endométriales.....	34
2.3.3	Construction des vecteurs servant pour l'immortalisation des cellules endométriales.....	34
2.3.3.1	Préparation du vecteur pBK-CMVΔ.....	34
2.3.3.2	Préparation du vecteur pBK-CMVΔ +TAg.....	35
2.3.4	La transformation des cellules endométriales.....	35
2.3.5	La sélection des cellules immortalisées.....	36
2.3.5.1	Le traitement à la généticine (G-418).....	36
2.3.5.2	La séparation des clones	36
2.3.6	L'entretien des lignées de cellules immortalisées.....	37
2.4	Études de l'expression de LIF bovin dans différents tissus..	37
2.4.1	La récolte de l'ARN provenant de différents tissus bovins.....	37
2.4.2	L'analyse de l'expression de LIF dans les différents tissus par RT- PCR.....	38
2.5	Analyse de l'expression du gène LIF bovin dans les cellules endométriales primaires (non transformées).....	39
2.5.1	La culture des cellules endométriales sous l'influence de stéroïdes	39
2.5.2	L'extraction de l'ARN à partir des cellules.....	39
2.5.3	Analyse de l'expression de bLIF par RT-PCR.....	40
2.5.4	Profil de l'expression de LIF selon les stéroïdes utilisés.....	41
2.6	Analyse de l'expression du gène LIF bovin dans les cellules endométriales immortalisées.....	41
2.6.1	La culture des cellules endométriales sous l'influence de stéroïdes..	41
2.6.2	L'extraction de l'ARN à partir des cellules.....	41
2.6.3	Analyse de l'expression de bLIF par RT-PCR.....	41
2.6.4	Profil de l'expression de LIF selon les stéroïdes utilisés.....	41
3.	RÉSULTATS.....	42
3.1	Clonage de la séquence génomique du gène LIF bovin.....	42
3.1.1	Analyse Southern de l'ADN génomique.....	42

3.1.2	L'amplification du gène LIF par PCR à partir de la banque génomique.....	42
3.1.3	Amplification de l'extrémité 3' non codant (RACE 3').....	47
3.2	Clonage de la séquence exprimée de LIF bovin (ADNc).....	47
3.2.1	La séquence ADNc de bLIF.....	47
3.2.2	La séquence du gène bLIF.....	51
3.2.3	Comparaison des séquences bLIF connues.....	51
3.3	Création de lignées cellulaires endométriales bovines.....	51
3.3.1	Cartographie des plasmides utilisés.....	51
3.3.2	L'utilisation de différentes concentrations de G-418.....	58
3.3.3	La transformation des cellules endométriales.....	58
3.4	Études de l'expression de LIF bovin dans les différents tissus.....	58
3.5	Analyse de l'expression du gène LIF bovin dans les cellules endométriales primaires (non-transformées).....	62
3.5.1	Analyse de l'expression par RT-PCR.....	62
3.5.2	Profil de l'expression de LIF selon la concentration de progestérone utilisés.....	65
3.6	Analyse de l'expression du gène LIF bovin dans les cellules endométriales immortalisées.....	65
3.7	Analyse des éléments de réponse.....	65
4.	DISCUSSION.....	69
4.1	L'analyse de l'ADN génomique.....	69
4.2	L'analyse de l'ADNc.....	70
4.2.1	L'analyse de l'extrémité 3' non codante.....	70
4.2.2	Comparaison entre l'ADN et ARN.....	71
4.2.3	L'analyse de la séquence protéique.....	71
4.3	L'étude d'expression de LIF dans différents tissus bovins...72	72
4.4	La construction de lignées cellulaires.....	73
4.5	L'influence des hormones stéroïdiennes.....	73
4.5.1	L'influence de différentes hormones sur les cellules primaires....	73
4.5.2	L'influence de différentes hormones sur les lignées cellulaires....	76
4.5.3	L'influence de différentes concentrations de progestérone sur les lignées cellulaires.....	76
4.5.4	L'analyse de séquences du gène LIF bovin pour des éléments de réponse aux hormones (HRE).....	77

CONCLUSION.....78
BIBLIOGRAPHIE.....79
ANNEXE.....92



LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Tableau comparatif indiquant le temps en jours du développement embryonnaire après la fécondation pour différentes espèces.....2
- Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de l'ADNc du gène LIF bovin.....24
- Tableau 3 : Tableau comparatif représentant le pourcentage d'identité de la séquence nucléotidique et protéique de différentes espèces.....56
- Tableau 4 : Tableau représentant l'emplacement des sites potentiels de réponse à l'estrogène (ERE).....67
-

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Résultats de la première amplification du gène LIF bovin.....	43
Figure 2 :	Analyse Southern de l'ADN génomique bovine.....	44
Figure 3 :	La stratégie de clonage du gène LIF bovin.....	46
Figure 4 :	La stratégie de clonage de l'ADNc du gène LIF bovin.....	49
Figure 5 :	La séquence d'ADN complémentaire du gène LIF bovin.....	50
Figure 6 :	La comparaison de la séquence d'ADNc du gène LIF de différentes espèces.....	53
Figure 7 :	La comparaison de la séquence protéique de LIF de différentes espèces.....	55
Figure 8 :	Schéma représentant la construction du plasmide utilisé pour l'immortalisation des cellules endométriales.....	57
Figure 8a :	Photo représentant une culture de la lignée Endo 8,2 des cellules endométriales immortalisées.....	59
Figure 9 :	Analyse de l'expression de bLIF par RT-PCR.....	61
Figure 10 :	Étude de la modulation de l'expression de LIF bovin par les stéroïdes....	63
Figure 11 :	Étude de la modulation de l'expression de GAPDH par les stéroïdes.....	64
Figure 12 :	Étude de la modulation de l'expression de LIF bovin avec différentes concentrations de progestérone.....	66
Figure 13 :	Étude des sites potentiels pour les éléments de réponse à l'estrogène et à la progestérone.....	68
Figure 14 :	Schéma représentant un hémacytomètre.....	130

ABBREVIATIONS

#:	Nombre
A:	Adénine
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<i>al.</i> :	Collaborateur
APS:	Ammonium persulphate
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine triphosphate
bLIF:	"Leukemia inhibitory factor" bovin
BSA:	Albumine du sérum bovin (Bovin Serum Albumin)
BSKS (+):	Vecteur de clonage plasmidique
bt:	Biothynylé
C:	Cytosine
Ci:	Unité de mesure Curie
CG:	Hormone chorionique gonadotropique
CMV:	Cytomegalovirus
CNDF ou CDF:	"Cholinergic neuronal differentiation factor"
CNTF:	"Ciliary neurotrophic factor"
CPM:	Compte par minute
CRBR:	"Canadian Breeding Research Council"
CRRA:	Centre de Recherche en Reproduction Animale
CsCl ₂ :	Chlorure de césium
CSF:	Facteur stimulant les colinies (colony stimulating factor)
DEPC:	Diéthyl pyrocarbonate
DIA:	Activité inhibitrice de la différenciation (differentiation inhibitory activity)
DIF:	Facteur inhibant la différenciation (differentiation-inhibiting factor)
DMEM:	Milieu de culture "Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DMSO:	Diméthyl sulfoxyde
DNase:	Enzyme de restriction détruisant l'ADN
dATP:	Désoxyadénosine triphosphates

dCTP:	Désoxycytosine triphosphates
dGTP:	Désoxyguanine triphosphates
dTTP:	Désoxythymidine triphosphates
dNTP:	Désoxynucléotides triphosphates
D.O.:	Densité optique
DRF:	Activité qui retarde la différenciation (differentiation retarding activity)
dT:	Poly thymidine
DTT:	Dithiothréitol
E ₂ :	Oestrogène
EDTA:	Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique
EGF:	Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
ERE:	Élément de réponse à l'oestrogène (estrogen response element)
FGF:	Facteur de croissance stimulant les fibroblastes (fibroblast growth factor)
G:	Guanine
G-418:	Généticine
GAPDH:	"Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase"
gp-130:	Glycoprotéine 130
GTP:	Guanine triphosphate
HILDA:	"Human interleukin for DA1A myeloid cells"
HRE:	Élément de réponse aux hormones (hormone response element"
HSF:	Facteur stimulant les hépatocytes (hepatocyte-stimulating factor)
ICM:	Masse cellulaire interne
IGF:	Facteur de croissance similaire à l'insuline (insuline-like growth factor)
IL:	Interleukine
INF γ :	Interféron gamma
INF τ :	Interféron Tau
IPTG:	Isopropyl-béta-D-thiogalactopyranoside
Kb:	Kilo paires de bases (unité de mesure pour les acides nucléiques)

kDA:	Kilo Dalton
LB:	Milieu de culture Lauria-Bertani
LIF:	"Leukemia inhibitory factor"
MCi:	Millicurie
Med:	Médium
Met:	Méthionine
MGI-2:	"Macrophage and granulocyte inducer-2"
MLPLI:	"Melanocyte-derived lipoprotein lipase inhibitor"
MMP-9:	"Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9"
MOPS:	(3-[N-Morpholino]propanesulfonicacid)
MWT:	Échelle de poids moléculaire phiX-174 digéré avec HaeIII et Lambda digéré avec HindIII
NaI:	Sodium inositol
NCS:	Sérum de veau nouveau-né (Newborn calf serum)
NEB:	Tampon de ligation de la compagnie New England Biolabs
NÉO:	Néomicine
OSM:	Oncostatin M
pBS α -crystalline + TAg:	Vecteur d'expression plasmidique
(α^{32} P)-dCTP:	Désoxycytosine radioactif en position alpha sur les phosphates
P ₄ :	Progestérone
pb:	Paire de base (mesure pour les acides nucléiques)
pBK-CMV:	Vecteur d'expression plasmidique
pBK-CMV Δ :	Vecteur d'expression plasmidique
PBS:	Saline tamponné au phosphate (Phosphate-Buffered Salin)
PCR:	Réaction de polymérisation en chaîne
pCRII:	Vecteur de clonage plasmidique
pGemT:	Vecteur de clonage plasmidique
PRE:	élément de réponse à la progestérone (Progesteron response element)
RACE 3':	Amplification rapide de l'extrémité 3' de l'ADNc
rLIF:	Récepteur pour LIF
rLIF β :	La sous-unité bêta du récepteur pour LIF
RPA:	Technique de protection à la ribonucléase (Ribonuclease protection assay)
RPM:	Rotation par minute

RPMI 1640:	Milieu de culture
RNase IA:	Enzyme de restriction qui détruit l'ARN
RT:	Transcription inverse
RT-PCR:	Transcription inverse, suivi d'un PCR
³⁵ S dATP:	Désoxyadénosine triphosphate radioactif sur la sérine
SDS:	Sodium dodécyl sulfate
SSC:	Tampon citrate de sodium
T:	Thymine
TAE:	Tampon à base de tris et d'acétate
TAg:	Anti-gène T su virus SV40
TBE:	Tampon à base de tris et acide borique
T ₄ :	Enzyme pour la ligation
T ₇ :	Enzyme et amorce pour le séquençage
Taq:	Enzyme de polymérisation <i>Thermophilus aquaticus</i>
TE:	Tris avec EDTA
Temed:	N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylne-diamine
TGF α :	Facteur de croissance transformant alpha (transforming growth factor alpha)
TGF β :	Facteur de croissance transformant beta (transforming growth factor beta)
TNF α :	Facteur alpha favorisant la nécrose des tumeurs (tumor necrosis factor alpha)
Tris-HCl:	Tris saturé avec du chlorure d'hydrogène
TTh:	Enzyme de polymérisation <i>Thermus thermophilus</i>
U:	Uracile
U:	Unité
uPA:	"Urokinase-type plasminogen activator"
UTR:	Région non-transcrite (Untranslated region)
U.V.:	Ultra-violet
W:	Watt
X:	Nombre de fois
X-Gal:	5-bromo-4chloro-3-indolyl-béta-D-galactoside
XL1-Blue:	E-coli (bactérie) utilisée pour le clonage

Je dédie cet ouvrage à ...

Rémi,

pour tous ses encouragements,
sa compréhension et
son amour continu aux fils des années.

Mes parents,

pour leurs encouragements,
pour m'avoir aidé financièrement pour que je
puisse obtenir une telle formation et surtout
pour m'avoir lancé un défi qui m'a permis
de me rendre où j'en suis aujourd'hui.

Tous les gens qui m'ont aidée à me rendre jusqu'ici.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de mon projet et qui m'ont encouragée tout au long de mon séjour au CRRA. Je tiens à souligner tout particulièrement la contribution apportée par:

Le **Docteur David Silversides**, professeur au département de biomédecine vétérinaire de l'Université de Montréal, qui a dirigé mon projet de maîtrise. Merci particulièrement pour avoir cru en moi et avoir gardé cet enthousiasme qui a souvent été un point de réconfort et d'encouragement.

Le **Docteur Alan Goff**, professeur au département de biomédecine vétérinaire de l'Université de Montréal et codirecteur de mon projet de maîtrise et au **Docteur Jacques Lussier** pour le support technique et nombreux conseils et pour m'avoir permis d'apprendre à leur côté.

À **Danielle Rannou** et **Carmen Léveillé** pour leur apport technique au niveau de la culture cellulaire et la culture en général.

À **Isabelle Daneau, Jean-François Éthier, Micheline Sicotte** et tout le personnel du CRRA qui m'ont apporté leur soutien technique et leur amitié.

Le département de nécropsie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour nous avoir procuré certains tissus nécessaires pour nos expériences.

Le "Canadian Breeding Research Council" (CBRC) pour avoir apporté un certain soutien financier par une subvention.

Aux employés de la compagnie Boviteq Inc. pour leur compréhension et leur encouragement constant lors de la finalisation de ce manuscrit.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La reproduction est un phénomène universel. Par contre, plusieurs de ses mécanismes sont encore mal connus. La reproduction, comme la plupart des différents systèmes, met en marche des séries de mécanismes dépendant les uns des autres. Ces mécanismes se confondent et peuvent même être redondants, ce qui rend la reproduction si complexe.

Chez les mammifères, l'utérus et l'embryon sont deux parties d'un ensemble qui formera le placenta. Les deux tissus doivent subir différentes étapes afin de se sensibiliser, devenir réceptif et se synchroniser. Pour ce faire, la communication entre l'utérus et l'embryon doit être efficace. Différents facteurs peuvent influencer ce type de communication ou influencer les tissus individuellement. Pour créer une vision d'ensemble des événements connus se produisant après la fécondation jusqu'au moment de l'implantation, une revue de ces événements est présentée.

1.1 LA COMMUNICATION ENTRE L'UTÉRUS ET L'EMBRYON CHEZ LES MAMMIFÈRES

1.1.1 Les différents stades du développement embryonnaire précédent l'implantation

Avant de pouvoir comprendre le principe d'action des différents facteurs impliqués lors de l'implantation, il faut souligner brièvement les étapes physiologiques que doivent entreprendre les différentes composantes impliquées. Après une certaine période de maturation, les ovocytes ou les spermatozoïdes (selon le cas) sont libérés et subissent une maturation dans l'oviducte avant de pouvoir s'unir par la fécondation et ainsi donner un zygote. Une division cellulaire sans augmentation de la dimension du zygote s'amorce. Au moment où l'embryon a atteint le nombre de 8 à 16 cellules, il porte alors le nom de morule. Au stade de 16 à 32 cellules, après avoir formé une cavité nommée blastocèle, il

porte alors le nom de blastocyste. Pour la plupart des mammifères, l'entrée dans l'utérus s'effectue 3 à 4 jours post fécondation. Le nombre de cellules et le nombre de jours requis pour atteindre un stade donné peut varier entre les espèces, comme le démontre le tableau 1. Ainsi, chaque espèce est particulière quant à son cycle reproducteur et sa vitesse de développement. Il est donc important de bien coordonner les études pour le temps désiré et selon l'espèce étudiée.

Espèces	Blastocyste (jours)	Entrée dans l'utérus (jours)	Implantation (jours)	Grandeur du trophoblaste (cm)
Bovin	5-6	3	17-19	200+
Humain	4,5-5	3-4	6-7	-
Lapin	3	3	6,5	-
Murin	3	3	4,5	-
Ovin	4,5	3	15-16	10-20
Porc	3,5-5	2,5-3,5	14-15	-
Rat	4,5	3,5	5,5	-
Singe (rhésus)	7	4	8-9	-

Tableau 1 : Tableau comparatif indiquant le temps en jours du développement embryonnaire après la fécondation pour différentes espèces.

(Rf : Papaioannou et Ebert , 1986)

Une période critique pour l'embryon est le moment où il doit activer son propre génome. L'ovocyte possède un bon bagage d'ARN pour permettre l'initiation de la transcription lors de la fécondation. En effet, au début de la fécondation l'activité transcriptionnelle provient surtout de l'ARN emmagasiné lors de l'ovogénèse maternel. Chez plusieurs espèces de mammifères, un blocage du développement embryonnaire (*in vitro*) s'effectue au moment de l'activation du génome embryonnaire. Ce blocage se voit à différents stades chez différentes espèces, soit au stade de deux cellules chez la souris, au stade de 8-12 cellules chez la vache, au stade de 4 cellules chez le porc (Thibault et Levasseur, 1991a).

1.1.2 Les différentes étapes de l'implantation

Pour certains chercheurs, il est difficile de parler d'implantation que s'il y a invasion du trophoblaste dans les tissus endométriaux comme c'est le cas pour plusieurs espèces. Toutefois, on parle d'apposition plutôt que d'une réelle implantation pour les espèces comme les ruminants, le porc et le cheval puisque l'invasion est restreinte. Par exemple seulement quelques cellules possèdent une activité du type à créer une invasion chez les ruminants. Les cellules spécifiques du trophoblaste fusionnent avec quelques cellules utérines pour former les cellules binucléées et multinucléées formant ainsi un syncytium alternant entre les cellules utérines simple et les cellules fusionnées pour donner un placenta cotylédonnaire.

Il existe toutefois différentes étapes qui sont mises en place afin de permettre à l'embryon de pouvoir s'implanter au sein de la mère (Thibault et Levasseur, 1991b). Ces différentes étapes consistent en fait à la perte de la zone pellucide, l'accolement et l'orientation du blastocyste, l'apposition, l'adhésion et l'invasion de l'endomètre. Ces étapes servent à mettre en place les mécanismes de communication qui permettront les échanges entre le fœtus et sa mère et créer une relation plus ou moins intime avec cette dernière.

L'embryon possède une enveloppe protectrice extra cellulaire, la zone pellucide, à l'intérieur de laquelle la taille de l'embryon ne varie que très peu. Au stade de blastocyste, la zone pellucide s'amincit de plus en plus, jusqu'à ce qu'un orifice soit créé pour libérer l'embryon de son enceinte. Suivant ce stade, l'embryon peut demeurer ainsi sans zone pellucide pour un temps déterminé (variable selon les espèces), s'entourer d'une enveloppe glycoprotéiques (lapin, jument) ou encore s'implanter immédiatement (souris) (Thibault et Levasseur 1991b). Une fois sorti de la barrière plus ou moins rigide que formait la zone pellucide, l'embryon et ses enveloppes foetales peuvent atteindre des longueurs significatives (le porc, la vache). Après la perte de la zone pellucide et un délai variable, le blastocyste est positionné dans l'utérus. Cette orientation au moment de l'implantation n'est pas aléatoire, elle dépend du type de placentation requis par l'espèce. Le type de placentation (d'implantation) est défini selon les points d'attachements du trophoctoderme à l'épithélium utérin. L'étape de l'apposition est caractérisée par des proliférations villosités qui envahissent les canaux glandulaires immobilisant l'embryon dans l'utérus. À cette étape les contacts entre l'embryon et la mère sont d'autant plus intimes mais demeurent toutefois lâches. Par la suite, un système d'interpénétration des

micro-villosités se met en place. Cette étape assure l'ancrage définitif de l'embryon à l'endomètre. À l'étape d'invasion, le trophoblaste pénètre les couches plus profondes de l'endomètre et s'introduit dans le stroma. Chez les espèces où l'implantation est plus invasive comme chez l'humain, l'épithélium recouvre le conceptus. Selon Thibault et Levasseur (1991b), trois types d'invasion se distinguent:

- L'invasion par intrusion: le trophoblaste s'insère entre les cellules épithéliales sans les lyser (furet et cobaye)
- L'invasion par déplacement: le trophoblaste phagocyte les cellules utérines (rat, souris et hamster)
- L'invasion par fusion: le syncytiotrophoblaste fusionne avec les cellules utérines et forme le syncytium (lapin, femme, macaque et vache)

Toutefois, chez les ruminants, cette activité d'invasion se limite à seulement quelques cellules.

1.1.3 La nutrition de l'embryon durant la période précédant l'implantation

Pendant la période précédant l'implantation, l'embryon doit pouvoir s'approvisionner d'une façon ou d'une autre pour lui permettre de se nourrir. La façon de faire varie d'une espèce à l'autre et d'un stade à l'autre. Une des méthodes utilisées est la diffusion selon les gradients de concentration de différents métabolites et du CO₂ à travers la zone pellucide. Certaines substances peuvent utiliser un transport plus spécifique afin de pénétrer les cellules dont les récepteurs membranaires (Thibault et Levasseur, 1991c). Au stade d'implantation, l'embryon peut également puiser ses réserves dans le fluide utérin souvent nommé lait utérin (Noden et De Lahunta, 1985) ou endolymph. Ce fluide est un produit des sécrétions des muqueuses utérines. Ce lait utérin contient des métabolites de faible poids moléculaire, des acides gras et des polysaccharides. Cette nutrition histotrophique permet d'acheminer les nutriments de la circulation sanguine maternelle au fœtus.

1.1.4 Différents facteurs qui influencent le développement de l'embryon et de l'utérus

La communication entre l'embryon et la mère doit s'établir assez tôt durant la grossesse. Cette communication est complexe et essentielle au bon déroulement de la grossesse. La communication peut s'effectuer à différents plans, soit sur le plan de la reconnaissance de la gestation ou des facteurs de croissance pouvant aider au développement de l'embryon. La reconnaissance de la gestation permet à l'embryon de faire parvenir différents signaux à la mère et ainsi lui permettre d'annoncer sa présence à la mère. Cette dernière peut donc maintenir les conditions physiologiques permettant à l'utérus de recevoir l'embryon. L'interféron τ (INF τ) est une molécule reconnue pour produire l'effet de reconnaissance de la gestation chez quelques espèces (Flint, 1995) dont la vache (Morgan et *al.*, 1993), le mouton (Mathialagan et Roberts, 1994), la chèvre et la truie (La Bonnardiere, 1993). Quant à la relation concernant les facteurs de croissance, celle-ci pourra permettre les échanges entre l'embryon et l'utérus afin d'établir les besoins nutritionnels et de maintenir le développement normal de l'embryon. Différents facteurs de croissance sont impliqués dans la relation qui s'établit entre la mère et le fœtus durant la période précédant l'implantation (de la fécondation à l'implantation). Il y a entre autres le facteur "colony stimulating factor" (CSF-1), le facteur "transforming growth factor" (TGF) α , le facteur "insulin-like growth factor" (IGF) 1 et 2, le facteur "fibroblast growth factor-4" (FGF-4), le facteur "leukemia inhibitory factor" (LIF), la sous-unité β du récepteur pour LIF (rLIF- β), la protéine gp130 (Stewart et *al.*, 1995), le facteur TGF β 1, l'interleukine-6 (IL-6) (Stewart, 1994) et le récepteur pour l'interleukine-6 (rIL-6; Sharkey et *al.*, 1995). Différentes techniques sont utilisées pour permettre de déterminer le rôle essentiel d'un facteur dans un système tel que le système reproducteur. Chez la souris, quelques chercheurs emploient la technique de mutation permettant l'invalidation spécifique d'un gène. En fait, l'absence d'expression du gène permet d'observer les effets phénotypiques qui se produisent en l'absence du facteur sélectionné. Ces facteurs peuvent agir à différents plans dont: la préparation utérine pour la réception de l'embryon en développement, au plan du développement de l'embryon et au plan de l'interaction foeto-maternelle.

Il est admis que chez les mammifères la croissance et le développement de l'embryon jusqu'à l'implantation sont indépendants des facteurs de croissance exogène, puisque le développement jusqu'au stade blastocyste de l'embryon peut s'effectuer dans un milieu salin. Toutefois cette indépendance aux facteurs exogènes n'exclue pas la

possibilité d'une dépendance face aux facteurs endogènes. Au moment de l'implantation, les relations entre la mère et l'embryon deviennent plus intimes et l'indépendance vis-à-vis des facteurs exogènes est modifiée (Stewart et *al.*, 1995).

L'absence de cytokines telles "tumor necrosis factor" (TNF) α , INF- γ , TGF α et β et la majorité des autres interleukines n'entraîne pas d'altérations des capacités de reproduction (Stewart et *al.*, 1995) mais peuvent toutefois interférer dans le développement ultérieur de l'embryon (Harvey et *al.*, 1995a). Par contre, Sharkey et *al.* (1995) pensent que des taux élevés du facteur TNF α peuvent agir directement sur l'embryon et aller jusqu'à diminuer la fécondité des individus. Ainsi, ces mêmes facteurs considérés seuls ne sont pas essentiels mais en groupe ils facilitent le développement précoce de l'embryon (Stewart, 1994). Par contre, d'autres facteurs comme le facteur "epidermal growth factor" (EGF), le facteur CSF, le facteur interleukine-1 (IL-1) et le facteur LIF jouent des rôles cruciaux.

1.1.4.1 EGF

Avant et pendant que l'embryon poursuit sa course le long de l'oviducte, l'utérus doit se modifier afin de pouvoir demeurer réceptif au besoin de l'embryon au moment de son entrée dans cet environnement où il poursuivra le reste de son développement.

L'expression de EGF se limite à l'épithélium luminal et glandulaire de l'utérus au jour 1 de la gestation chez la souris. Le facteur devient ensuite indétectable jusqu'à la 4^e journée de la gestation. À ce temps, l'expression est observable toujours dans l'épithélium luminal près de la bordure apicale et demeure détectable jusqu'au jour 5 (Huet-Hudson et *al.*, 1990). De plus, les embryons d'une souche particulière dépourvus de récepteur EGF (rEGF) fonctionnels démontrent des propriétés d'adhésion altérées. Ces embryons meurent peu de temps après l'initiation de l'implantation (Stewart et *al.*, 1995). Chez la souris, une augmentation d'oestrogène (E_2) avant l'ovulation entraîne une expression du facteur EGF dans les cellules épithéliales endométriales permettant une multiplication des cellules épithéliales glandulaires et luminales. Des traitements d'oestrogène exogène permettent également d'augmenter le taux d'EGF dans les cellules épithéliales endométriales (Harvey et *al.*, 1995a). La chute d'oestrogène et la production de progestérone (P_4) par le corps jaune diminuent cette prolifération cellulaire et enclenchera une différenciation des cellules épithéliales en un type sécrétoire. Une

seconde production de progestérone (vers le 3^e jour de grossesse) permet de nouveau une prolifération principalement des cellules endométriales stromales. Cette phase de prolifération des cellules stromales est également accompagnée d'une phase de différenciation des cellules stromales, essentielle pour la réceptivité de l'utérus (Stewart et *al.*, 1995). Chez la souris, ces modifications utérines initiées par les hormones stéroïdiennes sont mises en place par des facteurs de croissance synthétisées localement (Finn, 1982).

1.1.4.2 FGF

Le facteur FGF-4 se trouve indispensable à l'embryon murin en période d'implantation (Stewart et *al.*, 1995). En examinant les embryons ne possédant pas de récepteur pour ce facteur, on s'aperçoit qu'ils peuvent se développer jusqu'au stade de blastocyste et parviennent même à s'implanter. Toutefois, le développement cesse peu de temps après l'implantation (Feldman et *al.*, 1995).

1.1.4.3 IL-1

Un autre facteur d'intérêt pour la reproduction est IL-1 qui est détectable dans l'épithélium utérin de souris et ce, dès le premier jour de grossesse (McMaster et *al.*, 1992; Kover et *al.*, 1995). La présence de l'antagoniste de IL-1, IL-1 interrompt le processus d'implantation (Simon et *al.*, 1994). D'autres expériences réalisées sur des souris mutantes pour le récepteur IL-1 de type 1 ont permis de démontrer que la taille des portées diminuait et qu'aucun autre effet sur la capacité de reproduction n'a été observée sur les reproducteurs. Cet effet fut attribué aux caractéristiques de la souche utilisée tel que démontré par Finn (1982) avec le facteur EGF chez la souris.

1.1.4.4 CSF-1

Le facteur CSF-1 est exprimé dans l'épithélium luminal utérin de façon progressive tout au long de la grossesse chez la souris. Ce dernier est induit par l'action synergique de l'oestrogène et de la progestérone (Pollard et *al.*, 1987).

Le croisement d'une femelle homozygote pour la mutation du gène CSF-1 avec un mâle homozygote fertile n'a pas permis d'obtenir une progéniture viable. Toutefois, un croisement d'une femelle homozygote pour la mutation du gène CSF-1 (-/-) avec un mâle hétérozygote (+/-) ne fait que réduire la fertilité au lieu de supprimer la fertilité comme le cas précédent. Ainsi, l'effet encouru par le facteur CSF-1 n'est probablement pas dû à un effet maternel (Stewart et *al.*, 1995).

1.1.4.5 LIF et son récepteur (rLIF)

Un effet positif de LIF d'origine maternelle sur l'implantation du blastocyste a été observée. Son absence empêche l'implantation (Stewart et *al.*, 1992). Cependant, le mécanisme contrôlant l'implantation est mal connu. Il serait possible que LIF puisse agir sur l'utérus étant donné que les récepteurs ainsi que le cofacteur glycoprotéine 130 (gp 130) permettant la transmission du signal. Les deux molécules se retrouvent dans l'épithélium utérin et aucune expression n'est observée dans les cellules stromales utérines (Stewart et *al.*, 1995). LIF pourrait donc être impliqué dans la sensibilisation de l'utérus, le rendant réceptif aux signaux d'implantation (Stewart et *al.*, 1995). De plus, chez l'humain une relation directe entre les taux d'expression de LIF et la minceur de l'endomètre a été démontré (Hambartsoumian, 1997). LIF pourrait donc être impliqué dans la préparation de l'utérus humain. À cette effet, la liaison de LIF à son récepteur utérin permet deux modifications dans la réceptivité utérine (Stewart et *al.*, 1995):

- L'adhésion luminal permettant l'attachement et l'invasion par le trophoblaste (sensibilisation de la paroi interne de l'utérus).
- L'induction d'un lien entre l'épithélium luminal et le tissu stromal (décidualisation du stroma).

Selon Sharkey et *al.* (1995), dont les études ont été effectuées chez l'humain, rLIF ne peut agir directement sur l'embryon avant le stade blastocyste. Ce dernier ne possède effectivement pas de transcrit codant pour le rLIF avant ce stade. De plus, l'équipe de Nichols et *al.* (1996) a démontré la présence de LIF sur le trophoctoderme embryonnaire murin et l'équipe de Nachtigall et *al.* (1996) a démontré la présence du LIF sur le trophoblaste humain. Toutefois, le récepteur pour LIF (rLIF) a été observé sur la masse cellulaires internes de l'embryon (ICM) chez la souris. L'expression complémentaire de

LIF et son récepteur dans l'embryon pourrait suggérer une interaction paracrine, par contre, ce rôle n'est pas bien défini (Nichols et *al.*, 1996).

1.2 HISTORIQUE ET FONCTIONS DE LA MOLÉCULE LIF

Initialement la protéine LIF fut découverte chez la souris grâce à l'étude de cellules M1 leucémiques provenant de la moëlle osseuse (Tomida et *al.*, 1984). À ce moment, la molécule fut nommée Facteur D. Elle fut antérieurement nommée "macrophage and granulocyte inducer-2" (MGI-2) par le groupe de Lotem et Sachs (1980). En fait, cette protéine a la propriété de pouvoir différencier les cellules leucémiques en macrophages, ainsi, les cellules M1 perdent leurs caractéristiques leucémiques. L'injection de ce facteur dans des souris infectées de cellules leucémiques M1 a prolongé la survie de ces dernières (Lotem et Sachs, 1984).

D'autres groupes ont fait différentes études à l'aide de différents tissus. LIF se vu attribuer plusieurs fonctions aussi différentes les unes que les autres. Les rôles sont aussi variés que les tissus sur lesquels la protéine agit. Pour ne citer que quelques exemples, les rôles de LIF incluent la résorption de l'os *in vitro* (Abe et *al.*, 1986) à l'accumulation de calcium par les os (Metcalf et Gearing, 1989), à la modulation de la réponse inflammatoire (Stahl et *al.*, 1990). *In vitro*, LIF augmente les effets mitogéniques de l'interleukine-3 (IL-3) sur les cellules souches de mégacaryocytes (Metcalf et Hilton, 1991) et les cellules souches hématopoïétiques (Leary et *al.*, 1990). De plus, la prolifération de plusieurs types cellulaires dont les myoblastes est aussi amplifiée par LIF (Hilton et Gough, 1991). La fonction de cellules telles les neurones, les hépatocytes et les cellules adipeuses est affectée par LIF (Hilton, 1992). LIF peut aussi favoriser la survie des neurones embryonnaires (Murphy et *al.*, 1991). Le groupe de Mori et *al.* (1989) a déterminé que LIF pouvait aussi inhiber l'action de la lipoprotéine lipase et ainsi diminuer l'incorporation des acides gras par les adipocytes de type 3T3-L1. Les différents rôles de LIF *in vitro* demeurent très intéressants mais en comparant avec ce qui se passe *in vivo*, les rôles déterminés *in vitro* ont une correspondance pathologique.

Au point de vue de l'embryogenèse, la protéine produit des effets sur les cellules souches en empêchant leur différenciation et garder les cellules pluripotentes. En effet, l'ajout de 1000 U de LIF murin recombinant/ml de milieu de culture induit la formation de

colonies de cellules souches embryonnaires. L'état indifférencié des cellules (Williams et *al.*, 1988; Smith et *al.*, 1988).

Règle générale, le nom de la glycoprotéine varie selon le rôle attribué à la molécule étudiée. Ainsi, LIF peut aussi être identifié par le terme "Differentiation-inhibiting Factor" (DIF), le terme "Differentiation Inhibitory Activity" (DIA), le terme "Differentiation-retarding Factor" (DRF), le terme "Hepatocyte-stimulating Factor" (HSF), le terme "Cholinergic neuronal differentiation factor" (CNDF/CDF), le terme "Melanocyte-derived lipoprotein lipase inhibitor" (MLPLI) ou le terme "Human interleukin for DA-1A myeloid cells" (HILDA). Suite à l'étude de séquences des différentes molécules étudiées, l'homologie entre les activités biologiques observées et les séquences nucléotidiques et en acides aminés était évidente ce qui a permis de démontrer que toutes ces molécules étaient en fait la même (Smith et *al.*, 1988; Moreau et *al.*, 1988; Robertson et *al.*, 1993). De plus, grâce à la ressemblance aux cytokines, LIF peut être considéré comme faisant partie de cette catégorie (Hilton, 1992). En effet, LIF fait partie d'une famille de cytokines qui possède des fonctions et des structures similaires. Les autres membres de la famille des cytokines sont en fait: IL-6, oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (Gearing, 1993; Pennica et *al.*, 1995). Ces facteurs démontrent des redondances fonctionnelles dû aux effets similaires sur une variété de tissus. *In vitro*, tous ces facteurs peuvent être exprimés dans les cellules de l'endomètre humain et ainsi n'importe quel de ces facteurs peut contrôler le développement avant et pendant l'implantation de l'embryon. Toutefois, l'effet de redondance ne se produit pas *in-vivo* (Cullinan et *al.*, 1996).

La purification du Facteur D et ses homologues à partir des différentes sources a permis de découvrir des molécules sécrétées de différents poids moléculaires qui varient entre 20 et 70 kDa. Selon Tomida et *al.* (1984), la différence en grandeur du peptide pourrait être due à différents degrés de glycosylation. Toutefois, l'activité et la fonction de cette protéine ne semblent pas être affectées par le niveau de glycosylation.

Il existe deux formes de la protéine LIF chez la souris (Tomida et *al.*, 1984; Hilton et *al.*, 1988a; Robertson et *al.*, 1993; Rathjen et *al.*, 1990b). La première forme décrite par Rathjen et *al.* (1990b) est une forme soluble et diffuse à travers la membrane. La seconde forme, décrite par Rathjen et *al.* (1990b), est une forme immobile associée à la matrice extracellulaire. Règle générale, les protéines diffusées servent de médiateur pour la communication entre les cellules non adjacentes et permettent l'interaction de signaux

provenant de sources distinctes. La forme associée à la matrice cellulaire, pour sa part, permet le dépôt et l'emmagasinage de signaux pour un usage ultérieur (Rathjen et *al.*, 1990b). Les deux isoformes proviennent de transcrits primaires distincts qui varient par un épissage alternatif de l'ARNm. Ainsi, l'exon 2 et 3 sont commun pour les deux isoformes. Par contre, l'exon 1 ainsi que le promoteur demeurent spécifique à chaque isoforme. La localisation de la protéine (solubles ou associée à la membrane) est donc déterminée par l'exon 1 qui est transcrit par un promoteur spécifique à son isoforme (Rathjen et *al.*, 1990b).

Selon différents groupes de chercheurs, il est possible d'observer une différence d'activité biologique entre les régulateurs diffusés et immobiles tout au long du développement (Rathjen et *al.*, 1990b; Jessel et Melton, 1992). À propos de son activité inhibitrice sur la différenciation des cellules souches embryonnaires murines, les deux formes de la protéine LIF sont impliquées (Rathjen et *al.*, 1990b). L'équivalent de la forme mobile chez d'autres espèces que la souris n'a toujours pas été identifié (Robertson et *al.*, 1993). Chez l'humain, l'équipe de Cullinan et *al.* (1996), ont fait une analyse de protéine par "Western blot", ce qui a permis de déterminer l'existence de deux formes de la protéine LIF. Toutefois cette analyse ne permet pas de distinguer entre des isoformes d'épissage différents ou encore simplement un différent degré de glycosylation de la protéine.

1.3 CLONAGE DE LA MOLÉCULE LIF

Plusieurs groupes ont travaillé au clonage de la glycoprotéine LIF chez différentes espèces. Toutefois, le clonage initial de LIF fut exécuté par le groupe de Gearing et *al.* en 1987 à partir de cellules murines. Le groupe a purifié les facteurs LIF-A et LIF-B et poursuivit avec le séquençage partielle de la portion terminale de LIF-A. A partir de la séquence de cette portion N-terminale, un oligonucléotide a été construit ce qui a permis le criblage d'une librairie de séquence d'acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) de cellules T de la lignée LB3. Par la suite d'autres groupes ont isolé la protéine chez d'autres espèces. L'homologue humain de LIF fut cloné par le groupe de Gough et *al.* (1988) et ce à partir d'une librairie génomique utilisant comme sonde de l'ADNc murin. Pour ce qui est des gènes ovin et porcin, ils furent clonés eux aussi à partir d'une librairie d'ADN génomique utilisant comme sonde des fragments de la région codante

pour le gène LIF (Willson et *al.*, 1992). Ces fragments étaient à la fois homologues à l'humain et à la souris.

1.4 L'EXPRESSION DE LIF

1.4.1 La localisation spatiale de LIF

Selon Smith et Rathjen (1991), il est possible que l'expression de LIF se limite aux cellules souches ou encore, pour certains tissus, dans les cellules qui les supportent. De plus, les tissus possédant la capacité de se régénérer eux-mêmes peuvent aussi exprimer la protéine (Rathjen et *al.*, 1990a; Smith et Rathjen, 1991)

1.4.1.1 La localisation de l'ARNm dans les tissus reproducteurs

Selon Bhatt et *al.* (1991) le transcrite de LIF murin serait exprimé à la fois dans l'embryon et dans les tissus adultes chez la souris et serait sous contrôle maternel. Une des hypothèses retenue pour le rôle de LIF, étant donné son effet sur l'utérus et son effet possible sur l'embryon lui-même, est que ce facteur permettait de synchroniser l'interaction entre les deux tissus. Ainsi, les modifications physiologiques maternelles pourront être synchronisées avec le développement embryonnaire (Stewart et *al.*, 1995; Polan et *al.*, 1995). LIF est donc requis par l'utérus pour effectuer ses changements de décidualisation et par l'embryon pour lui permettre de s'implanter (Stewart, 1994).

L'équipe de Robertson et *al.* (1993) a déterminé que les tissus exprimant l'ARNm de LIF murin par la technique de protection à la ribonucléase. Il faut souligner que l'utilisation de cette technique, quoique sensible, ne tient pas compte de la protéine active mais seulement de l'ARNm. L'expérience a démontré que les tissus exprimant le plus fortement l'ARNm de LIF sont l'utérus suivi par l'intestins, la peau, l'oviducte et le poumon. De plus, le rein, le coeur et la rate expriment également LIF mais en quantité plus faible que les autres tissus. Le foie par contre, ne semble pas l'exprimer du tout. En fait, beaucoup de tissus expriment l'ARNm de LIF mais l'expression n'est pas uniforme pour tous les tissus. L'expression du transcrite de LIF est surtout associée aux tissus qui se renouvellent constamment (Rathjen et *al.*, 1990a; Smith et Rathjen, 1991). Une

expression aussi variée demeure cohérente avec les fonctions multiples de la cytokine (Robertson *et al.*, 1993). L'expression constitutive de l'ARNm se fait dans les tissus d'origines stromales et dans le placenta (Kojima *et al.*, 1994). La transcription et la libération de la protéine de l'embryon lui-même, ne se fait que pendant ou après l'éclosion de l'embryon de sa zone pellucide (Murray *et al.*, 1990).

Chez la souris, l'ARNm est exprimé dans la couche endométriale soit plus spécifiquement dans les cellules épithéliales glandulaires (Bhatt *et al.*, 1991) et luminales (Sharkey *et al.*, 1995; Polan *et al.*, 1995). Durant la grossesse, l'expression se situe à la fois dans l'endomètre et le décidua (le tissu stromal en différenciation). On retrouve aussi un certain taux d'expression dans le blastocyste durant la période précédant l'implantation. Suivant l'implantation, l'expression se situe surtout dans les tissus extra-embryonnaires (Conquet et Brulet, 1990; Robertson *et al.*, 1993). On ne retrouve aucune expression dans les cellules stromales (Stewart *et al.*, 1995). Les cellules endométriales épithéliales et stromales ovines ont cependant démontré la présence de l'ARNm et de la protéine LIF (Vogiagis *et al.*, 1997).

Chez l'humain, deux types de transcrits sont retrouvés dont une de 4 Kb et de 1,8 Kb. Le transcrit de 4 Kb est présent seulement durant les jours 21 à 28 du cycle menstruel (Moreau *et al.*, 1988). Par contre, les études de Vogiagis *et al.* (1996) ont démontré la présence d'un transcrit de 4,2 Kb. L'expression de LIF se retrouve partout dans la lumière de l'utérus (Chaouat *et al.*, 1995; Cullinan *et al.*, 1996) et glandulaire (Cullinan *et al.*, 1996) et ce durant tout le cycle selon Vogiagis *et al.* (1996). Lors de la grossesse, l'expression peut se retrouver dans le stroma en décidualisation près de l'épithélium luminal (Cullinan *et al.*, 1996). Toutefois, le degré d'expression demeure supérieur dans les cellules épithéliales (Kojima *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995)

1.4.1.2 La localisation spatiale de la protéine LIF

Chez la souris, la protéine LIF se retrouve dans l'épithélium glandulaire et luminal de l'endomètre ainsi que dans le myomètre utérin. Cette localisation est similaire chez le lapin (Yang *et al.*, 1994) et chez l'humain (Charnock-Jones *et al.*, 1994). Toutefois, chez l'humain la concentration de la protéine demeure variable selon le cycle oestral. Par contre, la protéine demeure en quantité constante dans le stroma pendant le cycle oestral complet (Vogiagis *et al.*, 1996). Les différences dans le patron d'expression de LIF d'une

espèce à l'autre sont probablement dues au contrôle hormonal qui est lui-même variable entre les espèces.

1.4.2 La localisation temporelle de LIF

Chez la souris, il existe deux périodes d'expression de LIF (Bhatt et *al.*, 1991; Shen et Leder, 1992) soit: à l'oestrus au moment de l'ovulation et au jour 4 de la gestation avant l'implantation.

Le temps correspondant à la deuxième période d'expression de LIF coïncide au moment de l'entrée de l'embryon dans l'utérus. Cette association suggère que l'expression de LIF pourrait être induite par l'embryon ou encore que l'expression soit complètement indépendante et sous un contrôle maternel (Bhatt et *al.*, 1991; Smith et *al.*, 1992). Les expériences de Stewart (1994) ont permis de trancher cette question. L'utérus de souris pseudo-gestantes avait le même profil d'expression de LIF que les femelles enceintes. Ainsi, l'expression de LIF dans l'utérus ne dépend pas de la présence de l'embryon.

Chez la souris, l'expression de LIF et de EGF seraient impliqués dans l'augmentation de la production de l'urokinase activateur de plasminogène (uPA) et de la metalloprotéinase-9 (MMP-9) (Harvey et *al.*, 1995a). Ces facteurs sont directement impliqués dans la formation du placenta et par le fait même impliqués dans l'invasion du trophoblaste dans les cellules stromales différenciées (décidua).

Chez l'humain, LIF est exprimé tout au long du cycle reproducteur et augmente à partir du milieu de la phase de sécrétion jusqu'à la fin de la phase de sécrétion soit entre les jours 19 et 25 du cycle menstruel (Chaouat et *al.*, 1995; Vogliagis et *al.*, 1996) coïncidant avec le moment de l'implantation (Nachtigall et *al.*, 1996; Cullinan et *al.*, 1996). Les études de Charnock-Jones et *al.* (1994) stipulent que l'expression de LIF est faible ou indétectable dans la phase de prolifération. Durant le premier trimestre de la grossesse, le taux d'expression est plus élevé pour les tissus déciduels comparativement aux tissus chorioniques (Sawai et *al.*, 1995).

Chez le porc, l'ARNm est à son maximum au jour 7 et 11 à 13 du cycle oestral (Anegon et *al.*, 1994). Pour ce qui est de la protéine son maximum est atteint au jour 12

de la gestation et jour 13 du cycle oestral. Chez le lapin, il n'y a qu'une seule période d'expression aux jours 5 et 6 de la gestation, soit avant l'implantation et non pas au moment de l'ovulation (Yang *et al.*, 1994)

1.4.3 Les signaux protéiques influençant l'expression de LIF

Les recherches de l'équipe de Arici *et al.* (1995) ont démontré que différents facteurs pouvaient influencer la production de LIF ou de son ARNm. Les substances telles Il-1 (Chaouat *et al.*, 1995), "tumor necrosis factor" (TNF), "platelet-derived growth factor", "epidermal growth factor" (EGF) ainsi que "transforming growth factor- β " (TGF- β) sont des substances qui induisent l'expression de LIF. Par contre, l'interferon- γ inhibe l'expression de la molécule. Chez la souris, les deux périodes d'expression de LIF coïncident avec l'augmentation d'oestrogène. L'expression peut même être induite par l'injection d'oestrogène dans le sang, suggérant que LIF serait sous le contrôle de l'oestrogène (Stewart, 1994).

1.4.4 Les hormones stéroïdiennes influençant l'expression de LIF

Des études préliminaires faites par l'équipe de Murray et Sower (1992) ont permis de démontrer que l'administration d'oestrogène et/ou de progestérone sur des moutons ovariectomisés pouvait engendrer la production de nouvelles protéines dans l'utérus. L'ajout d'oestrogène ou d'un mélange d'oestrogène et progestérone, a provoqué des changements morphologiques des cellules épithéliales endométriales (Murray, 1992). Chez la souris et le rat, l'oestrogène est essentiel pour l'induction de l'implantation dans un utérus pré-conditionné à la progestérone (Yoshinaga et Adams, 1966).

L'oestrogène augmente la production de LIF chez la souris et la progestérone ne produit pas d'effet. Il a été démontré que chez la souris ovariectomisée, la production de LIF est absente. Ces résultats démontrent que la production de LIF est sous contrôle hormonal (Yang *et al.*, 1996). Chez d'autres espèces, tel le lapin, on a observé un effet contraire. En effet, la progestérone augmente la production de LIF et l'oestrogène modifie à peine sa synthèse (Yang *et al.*, 1996). Toutefois, l'oestrogène utilisé en association avec la progestérone peut avoir un effet légèrement négatif sur la production de LIF chez le lapin (Yang *et al.*, 1996). Chez le lapin l'oestrogène n'est pas nécessaire pour l'induction

de l'implantation contrairement à la souris (Yang et *al.*, 1995). Un traitement à l'aide d'implant libérant d'abord de l'E₂ et de la P₄ par la suite a été infligé à des singes ovariectomisés. Des banques d'ADNc ont été établies selon la dominance hormonale. L'analyse par PCR de ces banques d'ADNc a permis de déterminer qu'en période de dominance à la P₄, la production de LIF était augmentée (Ace et Okulicz, 1995).

Chez l'humain, le patron d'expression de LIF semble varier en fonction du cycle menstruel chez la femme. La protéine est présente tout au long du cycle, mais atteint son maximum d'expression dans la deuxième phase du cycle menstruel normale (Chaouat et *al.*, 1995; Vogiagis et *al.*, 1996), correspond au moment où la progestérone est la plus élevée. Des études avec progestérone et oestrogène ont été exécutées sur des cellules stromales en culture. Les études n'ont pas démontré d'effet avec des traitements aux hormones stéroïdiennes en ce qui concerne les cellules stromales (Arici et *al.*, 1995). Les études de Sawai et *al.* (1997) démontrent cependant que l'oestrogène augmente l'expression de LIF dans le décidua (des cellules d'origine stromales). Ils ont noté une association directe entre l'expression de LIF et la dose d'oestrogène utilisée. Toutefois, aucun élément de réponse à l'oestrogène (ERE) n'a été retrouvé dans le promoteur de LIF, mais plusieurs éléments de réponse incomplète ont été identifiés. Les études de Laird et *al.* (1997) démontrent que l'oestrogène et/ou la progestérone diminuaient l'expression de LIF dans les cellules épithéliales endométriales chez l'humain. Toutefois en présence d'oestrogène, l'expression est demeurée plus élevée qu'en présence de progestérone. La progestérone procure peu ou pas d'effet sur ce type de cellules en culture (Sawai et *al.*, 1997; Laird et *al.*, 1997).

Chez le mouton, les études de Vogiagis et *al.* (1997) ont démontré une variation de l'expression de LIF à travers tout l'utérus d'animaux ovariectomisés et traités avec des sources exogènes de stéroïdes. Le traitement avec l'oestradiol de brebis ovariectomisées réduit l'expression de LIF. Par contre, les études réalisées par Lavranos et *al.* (1995) ne supportent pas les résultats de Vogiagis et *al.* (1997). Les études de Lavranos et Seamark (1989) démontrent que les cellules utérines exprimant LIF ont stimulé le développement de l'embryon précoce. Toutefois, les études de Lavranos et *al.* (1995) ont démontré que l'expression de LIF dans les cellules endométriales traitées aux hormones stéroïdiennes pendant 48 heures n'a pas modifiée de façon significative. Ainsi, l'effet positif que produit les stéroïdes ne semble pas s'appliquer aux cellules en monocouche chez la souris (Lavranos et *al.*, 1995).

1.4.5 Les éléments de réponse aux hormones (HRE)

Les stimuli hormonaux doivent souvent interagir dans la région du promoteur afin de permettre l'expression ou l'inhibition d'un gène donné. Le promoteur est composé de plusieurs régions ou boîtes de contrôle défini par quelques acides nucléiques que l'on nomme éléments de réponse. Il existe plusieurs éléments de réponse dont, l'élément de réponse aux hormones (HRE). Les éléments de réponse sont généralement retrouvés dans la région du promoteur du gène affecté, ce que l'on définit par les éléments de réponse en cis. Ils peuvent parfois être localisés loin du gène affecté, ce que l'on définit par élément de réponse en trans. En effet, plusieurs demi-séquences palindromiques de l'élément de réponse à l'oestrogène (ERE) ont été retrouvées à 3,3 Kb du site d'initiation de la transcription pour l'ovalbumine chez le poulet (Kato et *al.*, 1992). De plus, une partie de la séquence de ERE peut se retrouver dans la portion en 5' et se poursuivre dans la partie 3' du gène affecté (Sawai et *al.*, 1997).

Ces éléments de réponse peuvent agir en monomères, en homodimères ou en hétérodimères (Glass, 1994). Les éléments de réponse sont souvent composés de deux demi-séquences palindromiques séparées par 3 nucléotides. Ainsi, pour l'élément de réponse à la progestérone (PRE), la séquence reconnue est: AGAACAnnnTGTTCT (Ribiero et *al.*, 1995). L'élément de réponse à l'oestrogène fait partie des éléments qui présentent différentes configurations dont des répétitions directes, des palindromes, des palindromes inversés, et des demi-séquences isolées. La séquence reconnue par ce type d'élément de réponse est AGGTCA (Ribiero et *al.*, 1995; Glass, 1994) ou AGTTCA (Glass, 1994).

1.5 MODE D'ACTION DE LA MOLÉCULE LIF

Le poids moléculaire du récepteur pour le ligand LIF (rLIF) peut varier de 200 à 250 kDa selon les espèces (Godard et *al.*, 1992). Il existe actuellement deux types de récepteurs pour LIF suite aux études d'affinités (Yamamoto-Yamaguchi et *al.*, 1986; Hilton et *al.*, 1992). Le récepteur composé de la sous-unité β seulement est d'une affinité plus faible pour le ligand. Par contre, lorsque la sous-unité β est associée à la protéine gp130 ceci permet de modifier la sous-unité β et confère au récepteur une affinité plus élevée pour le ligand. La transmission du signal qui est d'origine maternel (Fry, 1992)

peut se faire par la protéine gp130. Cette dernière est aussi retrouvée dans d'autres systèmes tels IL-6, oncostatin M (OSM), toutefois, la protéine gp130 à elle seule n'a pas la capacité de lier LIF (Gearing *et al.*, 1991).

L'hétérodimérisation du rLIF (i.e. la sous-unité β associée à la protéine gp130) est nécessaire pour l'activité de LIF (Ware *et al.*, 1995). L'hétérodimérisation permet non seulement de transformer la sous unité β , de transmettre le signal mais aussi d'activer les tyrosines kinases cytoplasmiques de la famille Jak-Tyk et le complexe des hétérodimères de gp130. La plupart des cellules expriment les deux types de récepteur.

Il semble que ces derniers existent, tout comme la protéine, en une forme encrée dans la membrane (Mereau *et al.*, 1993) et une forme sécrétée dans le milieu (soluble). Cette dernière pourrait permettre de bloquer les actions systémiques indésirables que peut produire LIF (Lawton *et al.*, 1992). De plus, le rLIF humain ne permet pas de lier la protéine LIF de souris (Gearing *et al.*, 1991), laissant présager que les réactions récepteur/ligand sont spécifiques à l'espèce.

Les résultats obtenus jusqu'à présent tendent à démontrer que LIF serait impliqué dans la régulation de l'implantation de façon indirecte. Les études de Sawai *et al.* (1995) démontrent que chez l'humain LIF agirait sur les cellules déciduelles pour induire la production hormone chorionique gonadotrope (CG). Cette dernière est produite par le placenta pour maintenir l'activité du corps jaune et ainsi maintenir la gestation (Tortora et Anagnostakos, 1988). De plus, l'hormone CG permet de réguler la croissance du trophoblaste (Yagel *et al.*, 1989) et sa différenciation (Shi *et al.*, 1993). L'hormone pourrait être impliquée dans la stimulation du développement du trophoblaste en syncytiotrophoblaste au moment de l'implantation lorsque induit par les cellules déciduelles (Sawai *et al.*, 1995). Ainsi, la production de LIF peut contribuer de façon indirecte, par l'entremise de la CG, au développement de l'embryon.

1.6 ÉTUDES DE TRANSGÉNISME

Différentes études *in vitro* ont été exécutées chez la souris pour tenter de démontrer l'effet de LIF soit: son rôle biologique et son importance pour les animaux. Les études

ont portées sur l'annulation de l'effet de la protéine ou du récepteur, de même que sur la surexpression de LIF. Comme l'ont démontré différentes études, le dérèglement de l'expression de LIF, peut importe l'origine, affecte la progression normale du développement embryonnaire.

1.6.1 Études d'invalidation de la protéine LIF

Stewart et *al.* (1992) ont réussi à produire une génération F2 de souris (la progéniture de la souris initialement transformée) possédant une déficience du gène codant pour LIF. Les souris homozygotes (-/-) provenant de cette expérience ont un phénotype à peu près normal mais sont toutefois légèrement plus petits que les souris hétérozygotes. Les mâles ainsi que les femelles demeurent fertiles. Les blastocystes provenant d'un croisement mâle normal et femelle (-/-) ne parviennent pas à s'implanter dans la femelle (-/-). Par contre, lorsque ces blastocystes sont transférés dans une femelle normale, ils peuvent s'y implanter. Une preuve de plus que le contrôle est sous un contrôle maternel à ce stade.

L'analyse plus détaillée des tissus provenant des souris ne permettant pas l'implantation arborait une couleur plus pâle, une vascularisation peu développée et ne montrait aucun signe d'implantation. Par contre, les blastocystes étaient toujours présents. Même en absence totale de LIF, les embryons demeurent viables 2 à 3 jours après le moment prévu de l'implantation. Ainsi, selon Stewart et *al.* (1992), la présence de LIF murin demeure obligatoire pour permettre l'implantation. De plus, l'anatomie peu développée des tissus reproducteurs des souris homozygotes (-/-) corrobore avec les observations faites par Stewart et *al.* (1995) démontrant que LIF aurait un rôle à jouer dans la sensibilisation et la préparation de l'utérus.

1.6.2 Études d'invalidation du récepteur LIF

La mutation de la sous-unité β du rLIF provoque l'annulation de l'effet de LIF (Gearing et *al.*, 1991, 1992; Davis et *al.* 1993). Les embryons de souris dont le gène pour la sous-unité β du récepteur de LIF a été invalidé ont démontré une mortalité post-natale précoce (Ware et *al.* 1995) contrairement aux embryons invalidés pour le gène LIF qui ne sont pas viable du tout. Ware et *al.* (1995), Les embryons invalidés pour le gène

du rLIF dénotent des signes de réduction des composantes vasculaires foetales, des signes d'ostéopénie sévère, un nombre d'astrocytes réduit dans la moëlle épinière et des désordres métaboliques. La nature variée et importante des problèmes prévient la survie des embryons au-delà d'un jour après leur naissance. Comme les embryons déficients pou le rLIF s'implantent et se développent jusqu'à terme, ceci indique que l'effet de LIF murin sur le complexe utérus/embryon n'est pas absolument nécessaire pour le développement embryonnaire. Le complexe récepteur/ligand pourrait faire partie de la cascade d'événements qui mène au bon déroulement du développement de l'embryon (Ware et *al.*, 1995).

1.6.3 La surexpression de LIF

Contrairement aux deux autres études, la surexpression de la forme diffusible de la protéine LIF ne permet pas aux embryons de se développer au delà de 9,5 jours après la fécondation. La surexpression du gène LIF sous l'influence du promoteur CMV permet aux embryons de se développer plus ou moins normalement jusqu'au jour 6,5 après la fécondation et devient létale après 9,5 jours (Conquet et *al.*, 1992). La surexpression provoque une prolifération anormale des tissus et inhibe la différenciation du mésoderme (Conquet et *al.*, 1992). Ces études corroborent les études *in vitro* exécutées à l'aide de cellules souches embryonnaires (ES) (Williams et *al.*, 1988; Smith et *al.*, 1988).

1.7 EFFET DE LIF SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'EMBRYON

Malgré son importance, LIF n'est pas absolument nécessaire durant le développement embryonnaire dû à l'effet de d'autres cytokines permettant de couvrir, du moins en partie, les effets biologiques conférés par la présence de LIF (Robertson et *al.*, 1993). Par contre, plusieurs effets biologiques bénéfiques ont été observés qu'en présence de LIF. L'effet de LIF est peut notable entre le stade de morule (8 cellules) et le stade blastocyste. Par contre, l'effet devient plus évident au moment de l'éclosion et de l'attachement. En effet, une augmentation du nombre de blastocystes de souris atteignant l'éclosion et l'implantation a augmenté en présence de 1000 U de LIF humain/ml de milieu de culture. L'ajout de LIF d'origine humaine dans le milieu de culture de blastocyste ovin a provoqué une augmentation du nombre de blastocystes éclos et implantés (Fry, 1992),

ainsi qu'un effet positif sur les embryons de mouton au stade de deux cellules (Fry et *al.*, 1991). Toutefois, dans des expériences ultérieures cet effet n'est pas tout à fait aussi évident autant sur les embryons ovins que chez les embryons murins entre le stade de développement précoce et le stade de morule (Fry, 1992). Des contradictions similaires ont été rapportées sur l'influence de LIF humain sur les embryons humains. En effet, LIF humain n'a pas eu d'effet significatif sur le développement des embryons humains (Jurisicova et *al.*, 1995) alors que d'autres ont noté le contraire (Dunlison et *al.*, 1996). L'équipe de Jurisicova et *al.* (1995) supporte l'hypothèse que LIF ne serait pas détectable dans l'oviducte, ainsi les embryons se retrouvant dans l'oviducte n'auraient pas besoin de LIF ou n'auraient pas les éléments pour réagir à la présence de cette molécule. Il faut cependant tenir compte que les équipes de Bhatt et *al.* (1991) ainsi que Shen et Leder (1992) ont démontré que LIF était exprimé dans l'oviducte ainsi que dans l'utérus chez la souris ne supportent pas l'hypothèse émise par Jurisicova et *al.* (1995).

Des embryons bovins ont été maintenus en culture pendant pour une période de 14 jours en présence de LIF (Hassan-Hauser et *al.*, 1990). La grosseur du bouton embryonnaire (ICM) était toutefois anormalement élevée. Les résultats de différents chercheurs indiquent dans l'ensemble que LIF produit un effet bénéfique sur l'embryon dont les effets principaux sont de promouvoir l'éclosion (Hilton et *al.*, 1992) et l'inhibition sélective de la formation de l'ectoderme primitif tout en permettant la différenciation de celui-ci (Shen et Leder, 1992). L'effet de LIF sur les embryons de souris n'est cependant pas le même que chez les autres espèces pour un stade donné. Chez la souris, l'éclosion et l'implantation sont simultanées alors que chez la plupart des espèces ces événements s'étendent sur plusieurs jours. Ainsi, le rôle de LIF chez les rongeurs n'est probablement pas le même que chez les autres espèces pour le même stade de développement (Fry, 1992).

Le ratio gestation/naissance viable se trouve augmenté lorsque l'embryon transféré a été préalablement cultivé en présence de LIF. En effet, des embryons ovin de 8 cellules ont été récupérés d'une donneuse et mis en culture avec ou sans LIF humain pour être transférés par la suite dans des femelles receveuses. Le taux de gestation des embryons ayant été cultivés en présence de LIF humain s'est trouvé augmenté par rapport aux embryons cultivés sans traitement. Par contre, le taux de gestation des embryons cultivés en présence de LIF humain est le même que celui des embryons transférés immédiatement après la récolte. Ceci dénote que LIF ne servirait pas réellement à améliorer le

développement mais pourrait maintenir la viabilité des embryons pour un transfert ultérieur (Fry et *al.*, 1992).

1.8 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Une des nouveautés associée aux rôles biologiques de la protéine "Leukemia inhibitory factor" (LIF) est son effet probable au moment de l'implantation. Le rôle de LIF bovin au moment de l'implantation n'est pas encore démontré. L'étude du gène LIF bovin et de son expression nous permettra de recueillir plusieurs informations pouvant nous donner des indications quant aux rôles de LIF bovin durant la période précédant l'implantation et durant la période d'implantation. La revue de littérature a démontré que les recherches chez différentes espèces ne sont pas concluantes en ce qui concerne la modulation de l'expression de LIF par les hormones stéroïdiennes. Nous tenterons de déterminer l'effet de ces hormones sur les cellules endométriales bovines (épithéliales et stromales ainsi que les lignées de cellules endométriales immortalisées) en ce qui a trait à l'expression de LIF. De plus, la séquence génomique, la séquence de l'ADNc et le degré d'expression de LIF dans certains tissus seront déterminés pour l'espèce bovine.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CLONAGE DE LA SÉQUENCE GÉNOMIQUE DU GÈNE LIF BOVIN

2.1.1 L'isolation de l'ADN génomique

L'ADN génomique bovin a été isolé à partir de globules blancs du sang bovin. Le protocole suivi se retrouve en annexe en page 101.

2.1.2 L'amplification du fragment bLIF à partir de l'ADN génomique

2.1.2.1 L'amplification du fragment bLIF E-5

Le premier fragment du gène LIF a été amplifié à l'aide d'amorces consesus détuite à partir de séquences de différentes espèces soit: la souris, l'humain et le mouton. Pour l'amplification du fragment, 0,5 µg d'ADN génomique a été utilisé comme cible. Les amorces LIF.E et LIF.5 (tableau 2), l'enzyme TTh (*Thermus thermophilus*) ainsi qu'un tampon approprié pour le PCR ont fait partie de la réaction. Le tampon utilisé donnait une concentration finale de KCL 10 mM; de (NH₄)₂ SO₄ 10 mM; de Tris-HCl pH 8,8 20 mM; de MgSO₄ 2 mM; de Triton-X-100 0.1% et de BSA 100 mg/mL. Les conditions de température employées pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont les suivantes: 45 secondes à 95°C; 45 secondes à 62°C; 1 minute 30 secondes à 72°C. Ce cycle fut répété 40 fois. Une seconde amplification utilisant relativement les mêmes conditions a été exécutée pour amplifier le signal obtenu lors du premier PCR.

Après avoir amplifié le fragment E-5, des séquences spécifiques au bovin ont permis de déterminer d'autres amorces afin de définir le reste de la séquence du gène LIF bovin.

AMORCES UTILISÉES POUR L'AMPLIFICATION OU LE SÉQUENÇAGE DE bLIF

bLIF.C =	5' - CTGTCTTACAACACAGGCTCCAG
bLIF.E =	5' - <u>GAATTC</u> ATCAACCCCGTCAACGCCACCT
bLIF.5 =	5' - <u>GAATTC</u> ATGACCTGCTTGTATTTCCAG
bLIF.4Red =	5' - <u>GAATTC</u> CCCGTGATTAGCCATTAAGTACG
bLIF.G(Bt) =	5' - <u>GGATCC</u> AGCAACCTCATGAACCAGATCAGA
bLIF.6(Bt) =	5' - <u>GGATCCTT</u> CTTCTTCTGGAAGACGTCCTTGC
bLIF.H =	5' - <u>GGATCCA</u> ACAACCTGGACAAGCTGTGCA
bLIF.7 =	5' - <u>GGATCCT</u> GTTGAGTTGTCCCAGCTGGTT
bLIF.I =	5' - TCTGCTCAGCAACGTGCT
bLIF.J =	5' - CTTAGATAGTAGGGGACT
bLIF.8 =	5' - AGTGTGGTCATTCTGCTG
bLIF.9 =	5' - <u>GGATCCT</u> GGTTCATGAGGTTGCTGGGACA
bLIF.10 =	5' - <u>GAATTC</u> TAGGTCACGTCCACGTGGCTCAC
bLIF.K =	5' - <u>GAATTC</u> TGGCTGACCTTGAAAGGTCTGGT
bLIF.L =	5' - <u>GAATTC</u> TCAGCCAGGGTCTTTGTGAGCAA
bLIF.11B =	5' - <u>GAATTC</u> GCCAAGACCTTCATTATGGGCTG
bLIF/EXP.A =	5' - <u>GGATCCT</u> CTGGAGTGCAGCCCATAATG
bLIF/EXP.1 =	5' - <u>AAGCTT</u> AAGACCTCCCGTCTAGAAGGCCT
bLIF.M =	5' - TTGTGCAGCAAGTACCACGTGAC
bLIF.N =	5' - AGGCAGAGAGAGGCCACATGTAG
bLIF.13 =	5' - CGTACCTCTGTGTGACCTCA
GAPDH.1 =	5' - AGGTCCACCACCCTGTTGCTTTGG
GAPDH.A =	5' - TCCTGCACCACCAACTGCTTAGC
Sp6 =	5' - GATTTAGGTGACACTATAG
βGAL.B =	5' - TGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCA
T3 =	5' - GGCCAATTAACCCTCACTAAAGGGAA
T7 =	5' - TAATACGACTCACTATAGGG
DWS 189 =	5' - <u>GGATCCA</u> AGCTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGG(T) ₁₇
DWS 190 =	5' - <u>GGATCCA</u> AGCTTGAATTCTAATACG

Tableau 2: Liste des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de l'ADN génomique et l'ADNc du gène LIF bovin.

Les sites de restriction sont soulignés.

2.1.3 Analyse Southern de l'ADN génomique

Selon les études faites par Gearing *et al.*, (1987) ainsi que celles faites par Gough *et al.*, (1988), une digestion par l'enzyme de restriction BamHI génère une bande d'environ 4 Kb avec une sonde provenant du gène LIF. Pour cette raison, une digestion de 10 µg d'ADN génomique, récupérée à partir de globules blancs, a été réalisée avec différents enzymes de restriction dont: BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, SacI, Sall, SmaI, XbaI et XhoI. Les digestions ont été chargées sur un gel d'agarose de 0,8 %. Le tout a été transféré sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham) et l'ADN fixé sur la membrane à l'aide de rayons U.V. (150 Joules). La sonde utilisée pour l'hybridation a été construite à partir du fragment bLIF E-5. L'hybridation ainsi que les lavages ont été effectués à 65°C.

2.1.4 La création d'une banque d'ADN génomique sélectionnée

Une digestion de 10 µg d'ADN génomique a été réalisée dans le but d'isoler les fragments contenus entre 3,6 et 4,5 Kb observés suite à l'analyse southern. Les fragments d'ADN ont été isolés de l'agarose par le système amicon suivi de la technique centricon décrite en annexe et ont été insérés dans le vecteur BSKS (+) pour créer une mini banque d'ADN génomique sélectionnée ou laisser tel quel. Cette banque génomique d'ADN a permis d'amplifier plusieurs sous-clones du gène LIF.

2.1.5 L'amplification du gène LIF par PCR à partir de la banque d'ADN génomique sélectionnée

Les fragments bLIF H/T₃ bLIF L/11B et bLIF Exp.A/7 ont été amplifiés à partir de la banque d'ADN génomique. Ces fragments ont été amplifiés grâce à des amorces spécifiques à l'espèce bovine sauf pour l'amorce T₃ et βGalB (tableau 2) spécifique au vecteur dans lequel le fragment HT₃ a été sous cloné.

2.1.5.1 Le fragment bLIF H/T₃

L'amplification du fragment bLIF H/T₃ a été réalisée par PCR selon la méthode décrite en annexe.

L'enzyme "Expand" de Boehringer ainsi que le tampon correspondant ont été utilisés pour la PCR. En premier lieu, une amplification avec les amorces β GAL.B/bLIF.6(bt) a été effectuée. Pour confirmer les résultats obtenus, une deuxième amplification avec les amorces bLIF.H et T₃ (tableau 2) a été exécutée. Les amorces β GalB et T₃ sont des amorces spécifiques au vecteur BSKS (+) dans lequel la banque d'ADN génomique sélectionnée a été sous-clonée.

Pour faire le premier PCR bLIF β GalB/G(bt), une ligation avec 2 μ L de BSKS (+) 4 Kb de la banque génomique a été utilisée. Pour ce qui est du second PCR (ancré) bLIF H/T₃, nous avons utilisé 1 μ L du premier PCR comme cible. La température utilisée pour permettre à l'amorce de se fixer à l'ADN est de 60°C pour ce qui est du premier PCR et de 69°C pour le second PCR. Les conditions de température ont été les suivantes: 30 secondes à 95°C; 30 secondes à 60°C ou 69°C selon le cas; 2 minutes et 30 secondes à 70°C. Ce cycle fut répété 40 fois.

2.1.5.2 Le fragment bLIF L/11B

Pour le fragment bLIF L/11B, l'amplification a été réalisées avec les amorces spécifiques à l'espèce bovine, c'est-à-dire bLIF.L et bLIF.11B (tableau 2). Après cette amplification, le fragment a été soumis à un sous-clonage directement du PCR au vecteur pGemT de Promega (parce que ce vecteur permet d'insérer des fragments possédant un A à son extrémité souvent ajouté par la polymérase lors du PCR). Pour faire l'amplification de ce fragment, 1 μ L de l'autoligation (2 μ L d'ADN génomique autoligué) a été utilisé. Les conditions de PCR se résument à 10 minutes à 95°C; 55 secondes à 68°C; et 2 minutes et 30 secondes à 70°C. La polymérase "Expand" a été ajoutée au mélange seulement lorsque la température eut atteint 75-80°C après le 10 minutes à 95°C. Ce temps d'exposition à 95°C permet au brin d'ADN riche en G-C de se dénaturer adéquatement puisque chez différentes espèces la région 5' de l'ADNc est riche en G-C.

Il est à noter qu'une seconde amplification d'un fragment en 5' a été effectuée à partir de l'autoligation mais en utilisant cette fois les amorces β GalB/11B pour le premier PCR et β GalB/12 pour le deuxième PCR (PCR ancré). Toutefois, le séquençage de ces fragments n'a pas été poursuivi, ces amplifications ont servi pour la confirmation des résultats de l'amplification avec L/11B. Le clonage du fragment bLIF L/11B dans le vecteur a été réalisé directement à partir de 1 μ L du PCR et 0,5 μ L du vecteur pGemT.

2.1.5.3 Le fragment bLIF Exp.A/7

Pour ce qui est du fragment bLIF Exp.A/7, il a été amplifié à partir du PCR LIF.C/bLIF.4red. Les conditions du premier PCR (C/4red) sont de 45 secondes à 95°C; 30 secondes à 67°C; 2 minutes à 70°C. Ce cycle fut répété 40 fois. L'amplification a été effectuée à partir de 0.5 mL de la banque d'ADN génomique de 4 Kb ainsi que l'enzyme Expand de Boehringer et le tampon correspondant. Pour ce qui est des conditions de température pour le second PCR (Exp.A/7), elles sont les suivantes: 45 secondes à 95°C; 30 secondes à 67°C; 2 minutes à 70°C. Ce cycle a été répété 40 fois. Les polymérases "Expand" de Boehringer et *Thermophilus aquaticus* (Taq) de Cetus ont été utilisées et ce, avec les nucléotides Deaza G. Ces derniers permettent une meilleure amplification des séquences riches en G-C puisqu'ils déstabilisent plus facilement les fragments d'ADN créés par PCR où les nucléotides Deaza G se sont insérés. Le fragment bLIF Exp.A/7 a été amplifié à plusieurs reprises sans toutefois être sous cloné dans un vecteur. La séquence n'a donc pas été étudiée.

2.1.6 L'étude de différents fragments provenant du PCR

Pour déterminer les conditions de l'amplification propres à chaque fragment, il faut consulter les sections correspondant au fragment. La température fixée pour permettre l'attachement de l'amorce à l'ADN dépend de la proportion en A, T, C et G. Ainsi la température augmente de 2°C à chaque A ou T et de 4°C à chaque C ou G. Tous les PCR ont été réalisés dans un appareil à PCR de type Ericomp spécialement conçu pour ce type de réaction. De plus, les polymérases ont été ajoutées lorsque la température des échantillons eut atteint une température se situant autour de 80-85°C. Ceci permet d'augmenter la demi-vie de l'enzyme.

2.1.7 Le clonage des fragments de PCR

2.1.7.1 Préparation du vecteur pGemT

Certaines polymérases ajoutent des A supplémentaires au bout 3' lors de l'amplification par PCR. Ainsi, pour le clonage des fragments provenant d'une amplification par PCR, il est donc plus facile d'utiliser un vecteur possédant des T aux extrémités 5'. Le vecteur pGemT de Promega, comme son nom l'indique, possède ces T supplémentaires aux extrémités. Ce vecteur est compris dans une trousse de ligation de Promega.

2.1.7.2 Préparation du fragment

Règle générale, une partie de la réaction finale de PCR doit être chargée sur un gel d'agarose de 0,8 à 1 % et les fragments, purifiés (voir protocole "band prep" en page 107 de l'annexe) ou par une autre technique comparable. La purification sert à éliminer la possibilité de cloner d'autres bandes présentes dans le produit de PCR. La purification sert aussi à éliminer les produits pouvant nuire à la ligation, tel le tampon de PCR, les dimères d'amorces, les amorces, les dNTP, etc.

Par contre, il est possible d'utiliser la réaction de PCR directement dans le cas où la concentration du fragment demeure trop faible après la purification ou lorsqu'une seule bande apparaît sur le gel d'agarose lors de la visualisation. Pour ce dernier cas, il faut toutefois demeurer prudent puisque la bande peut être présente dans la réaction être détectable lors de la visualisation. Lorsque la réaction de PCR est utilisée directement, il faut toutefois tenir compte de la concentration des produits de PCR nuisibles pour la réaction de ligation.

2.1.7.3 La ligation

Le protocole suivi pour les ligations au vecteur pGem-T est décrit en page 94 de l'annexe. Les volumes utilisés pour la ligation sont de 0,5 μ L pour le vecteur pGemT, le volume maximal d'insert (fragment de PCR purifié à partir d'un gel d'agarose) ou 1-2 μ L (PCR directement), 1 μ L de tampon de ligation 10X et 1 μ L de ligase. Le tout fut gardé à

16°C pendant toute la nuit. La ligase, le tampon 10X, et le vecteur proviennent d'une trousse pGemT de Promega.

Lorsque la trousse est utilisée pour la première fois, il est utile de faire une ligation contrôle (sans insert) pour déterminer la quantité de vecteur pouvant se refermer sur lui-même et ainsi définir le bruit de fond créé par le vecteur seulement (sans insert). Ce contrôle est d'autant plus important lorsque le vecteur utilisé ne comporte pas de mode de sélection visuelle par le gène LacZ.

2.1.7.4 La transformation et la sélection des clones avec le vecteur pGemT

Après la ligation, 5-10 µL de plasmides (vecteurs avec et sans insert) ont été transformés dans 100 µL de bactéries XLI-Blue (lorsque pGemT est utilisé) rendues compétentes chimiquement. Les bactéries deviennent compétentes grâce à des pores créés par différents traitements avec des solutions spécifiques. La transformation est mécanique et chimique, c'est-à-dire que par des changements de température le plasmide pénètre la bactérie par les pores laissés par les solutions au moment de les rendre compétentes. Après les différents traitements de température, les bactéries ont été diluées dans 500 µL de LB et laissées à 37°C pour leur permettre de reprendre leur état normale. Suite à la transformation, les bactéries ont été centrifugées et transférées sur une gélose nutritive composée de LB, d'agar, de X-Gal et de IPTG.

Les bactéries XLI-Blue permettent l'expression du gène LacZ. Ce dernier est interrompu en présence d'insert. Ainsi, lorsqu'une colonie bactérienne apparaît bleue sur la gélose contenant du X-Gal et du IPTG, cela signifie que cette colonie possède des bactéries avec plasmides n'ayant pas d'insert. Alors que si la colonie apparaît blanche, c'est que le plasmide possède un gène LacZ interrompu et il possède donc un insert. Le vecteur pGemT possède le gène LacZ. Il devient donc facile d'identifier visuellement un clone possédant un plasmide avec insert.

2.1.7.5 La validation de l'insert par mini-préparation de plasmide

Après la sélection visuelle des clones, l'ADN plasmidique a été extrait des bactéries pour en vérifier l'insert. Pour ce faire, chaque colonie sélectionnée a été mise en

culture de 2-5 mL pour la nuit. Ceci a permis d'augmenter la concentration de plasmide puisque la bactérie en se multipliant, reproduit ainsi que le plasmide. Après une nuit de croissance, la culture bactérienne a été récupérée pour en extraire l'ADN plasmidique contenu dans les bactéries (le protocole suivi est en annexe). Après la purification de l'ADN, une digestion enzymatique à l'aide d'enzymes de restriction a été exécutée pour vérifier la présence et la longueur de l'insert dans le plasmide.

Après avoir sélectionné les clones possédant les coordonnées désirées, il a été nécessaire de les purifier en procédant à une deuxième transformation. Celle-ci ne nécessite seulement que 0,5 µL de mini-préparation de plasmide et 25 µL de bactéries compétentes. De cette deuxième transformation, il est possible de procéder soit à une extraction de plasmides pour le séquençage ou faire une maxi-préparation de plasmides (extra pure) afin de générer une grande quantité de plasmides. Généralement le séquençage est fait d'abord afin de valider la séquence de l'insert, puisque deux fragments peuvent avoir la même taille sans avoir la même séquence. Par la suite on procède à la purification du plasmide en grande quantité.

2.1.7.6 Maxi-préparation de plasmide

La technique de purification au chlorure de césium permet une bonne purification de la préparation (voir annexe pour le protocole détaillé). Ainsi, les DNases, l'ARN, les protéines, etc. sont enlevés ce qui permet d'éviter la dégradation de l'ADN. Cette technique est employée surtout pour la conservation de l'ADN à long terme.

2.1.8 Le séquençage des différents fragments obtenus

Suivant une deuxième transformation afin de purifier le clone, une préparation de plasmides de type "Magic-mini" (Promega) a été effectuée. Suite à la réaction de séquençage peut s'exécuter. La technique de séquençage utilisée se conforme à la méthode de Sanger. La trousse de séquençage avec la polymérase T₇ (Pharmacia) a été utilisée. Les directives du manufacturier ont été respectées (voir l'annexe pour plus de détails). L'isotope radioactif ³⁵S dATP (DuPont) a été utilisé pour cette réaction.

Il arrive que la polymérase insère des mutations lors de l'amplification par PCR afin d'éviter d'obtenir une séquence faussée par la polymérase, il est donc préférable de séquencer 3 clones différents et retenir la séquence consensus.

2.1.9 Amplification de l'extrémité 3' non codant de l'ADNc (RACE 3')

Les fragments de 3,6 à 4,5 Kb ne permettant pas d'amplifier le bout 3' non codant de l'ADNc. Pour ce faire, un échantillon d'ARN polyA+ provenant de l'ARN total isolé du poumon et de cellules endométriales épithéliales primaires (non transformées) a été générée. Par la suite, une amplification par transcriptase inverse (RT-PCR) a été effectuée. Pour la transcription inverse, une amorce universelle poly dT (DWS189; tableau 2) incluant des sites spécifiques pour des enzymes de restriction a été utilisée. Un premier PCR avec les amorces DWS190 (tableau 2; incluant les mêmes sites de restriction que DWS189 plus quelques sites particuliers pour cette amorce) et bLIF.L (tableau 2) spécifique au gène LIF a été exécuté. Le PCR ancré a été réalisé à l'aide des amorces DWS191 et bLIF.K (tableau 2). Une fois les fragments amplifiés par PCR, ils ont été sous-clonés en considérant la source d'ARN. Trois clones provenant de deux tissus différents ont été séquencés.

2.1.10 Amplification de l'extrémité 5' du gène LIF

Le fragment bLIF L/11B décrit plus haut correspond à l'amplification du bout 5'. Pour amplifier le bout 5' du gène LIF, une ligation de 2 µL du fragment de 4 Kb a été exécutée. Les fragments se referment sur eux-même pour ainsi former une autoligation puisqu'ils ont des sites BamHI aux deux extrémités. L'autoligation a été exécutée dans un grand volume (100 µL) dans le but de minimiser les ligations de fragments entre eux. En augmentant le volume à 100 µL, les fragments sont moins denses et les risques de rencontre sont minimisés. Pour l'amplification de la portion 5', 1 µL de l'autoligation fût utilisée. Pour ce qui est des amorces utilisées, il est nécessaire de se servir d'une amorce sens en 3' du gène et une amorce antisense au bout 5' du gène.

2.2 CLONAGE DE LA SÉQUENCE EXPRIMÉ DE LIF BOVIN (ADNc)

2.2.1 L'isolation de l'ARN utilisé pour le clonage

L'ARN utilisé dans cette section correspond à celui de la section 2.2.1 et fut isolé à partir des cellules endométriales épithéliales primaires ainsi que l'ARN isolé du poumon.

2.2.2 Le clonage dans le vecteur pCRII

Pour le clonage de l'ADNc, le vecteur pCRII a été utilisé au lieu de pGemT. L'utilisation du vecteur pCRII (In Vitrogen) permet d'éviter la contamination avec les séquences (fragments) génomiques déjà clonées avec le vecteur pGemT puisque les deux vecteurs n'ont pas tout à fait les mêmes sites de restriction. Il est donc facile de différencier les deux vecteurs par une digestion avec les enzymes de restriction appropriées. Le mode de sélection avec IPTG et X-Gal demeure le même que ce qui a déjà été mentionné à la section 2.1.7.4 puisque pCRII possède lui aussi le gène LacZ.

2.2.2.1 La ligation

Le protocole suivi se trouve à l'annexe, toutefois certaines conditions demeurent spécifiques selon le vecteur utilisé, telles les quantités d'insert et de vecteur utilisés. Avec le vecteur pCRII, 2 μ L du premier PCR Exp.A/Exp.1 avec 2 μ L du vecteur pCRII ont été utilisés. Le tout est incubé à 16°C pour la nuit.

2.2.2.2 La transformation

Une fois la ligation complétée, le plasmide a été incorporé dans les bactéries "One Shot" (fourni dans la trousse de In Vitrogen) rendu compétente chimiquement et soumis à différents traitements de température (le protocole utilisé se trouve en annexe).

2.2.3 Le séquençage

Une fois les clones sélectionnés et purifiés (tel que mentionné à la section 2.1.7.4), nous avons procédé au séquençage des insert inclus entre les amorces T₇ et Sp6 du vecteur de clonage (pCRII). Si la séquence comprise entre les amorces T₇ et Sp6 correspond à la séquence espérée, d'autres réactions de séquences avec différentes amorces internes (spécifique à la séquence désirée) ont été réalisées afin d'obtenir la séquence complète de l'insert. La méthode de séquençage utilisée est la méthode décrite par Sanger avec la polymérase T₇ comprise dans la trousse de séquençage de Pharmacia.

2.3 CRÉATION DE LIGNÉES CELLULAIRES ENDOMÉTRIALES BOVINES

2.3.1 Isolation de cellules endométriales épithéliales bovines

Les cellules endométriales ont été isolées à partir de l'épithélium d'une corne correspondant à un ovaire possédant un *corpus hemorrhagicum*. Pour permettre la récupération des cellules de la lumière de la corne, cette dernière a été inversée de façon à obtenir l'intérieur de la corne à l'extérieur. Les extrémités de la corne ont été cousues ainsi que de part et d'autre du milieu de la corne, après quoi la corne fut coupée en deux. De cette façon, toutes les extrémités se trouvent fermées. Le protocole utilisé se trouve en annexe.

Chaque moitié de corne a été incubée avec de la trypsine (Sigma) pour permettre aux cellules épithéliales (cellules de la lumière utérine) de se détacher. Cette technique ne permet pas de sélectionner exclusivement les cellules épithéliales, il arrive que des cellules stromales se détachent par la même occasion. Les cellules récupérées ont été identifiées "cellules endométriales", puisqu'il est possible que les lignées contiennent à la fois des cellules épithéliales et des cellules stromales. Après leur isolation, les cellules endométriales ont été mises en culture pour une durée d'environ 10 jours avant de leur faire subir un traitement.

2.3.2 Culture des cellules endométriales

Les cellules ont été mises en culture sur un tapis de matrigel (Collaborative Biomedical Products) servant à faciliter l'adhésion des cellules épithéliales. Ceci imite l'environnement des cellules épithéliales retrouvées *in vivo*. Ce type de cellules nécessite un lien étroit avec d'autres cellules pour une croissance adéquate. Le milieu utilisé pour la culture fut le DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, de 1% d'antibiotique-antimicotique et de 200 mM de glutamine. Le milieu DMEM avec tous ces suppléments ajoutés est le milieu appelé DMEM complet. Ce dernier fut changé, par du milieu frais préchauffé à 37°C, les lundis, mercredis et vendredis. La quantité de milieu ajoutée a varié selon le jour et le pétri de culture utilisé.

	Lundi et mercredi	Vendredi
Puits de 35 mm:	3 mL/puits	4 mL/puits
Puits de 16 mm:	1 mL/puits	2 mL/puits
Boîte de culture (50 mL):	5 mL/puits	7 mL/puits
Boîte de culture (200 mL):	20 mL/puits	32 mL/puits

2.3.3 Construction des vecteurs servant pour l'immortalisation des cellules endométriales

Le plasmide pBK-CMV Δ +TAg (figure 8) fut construit à partir d'éléments provenant de deux autres plasmides dont le plasmide pBS+ α -crystalline et TAg (figure 8) et le plasmide pBK-CMV Δ (figure 8).

2.3.3.1 Préparation du vecteur pBK-CMV Δ

Pour des raisons de toxicité, le promoteur du gène Lac (pLac) a été enlevé par une digestion avec les enzymes de restriction NheI et SpeI. Avant d'ajouter l'enzyme NheI, le vecteur a été prédigéré avec SpeI environ 1-1,5 heure. Suivant la digestion, le tout a été chargé sur un gel d'agarose 1% pour permettre la purification du plasmide digéré NheI/SpeI. Les enzymes NheI et SpeI étant compatibles, le vecteur a été ligué pour obtenir un plasmide sans promoteur Lac (pBK-CMV Δ).

2.3.3.2 Préparation du vecteur pBK-CMVΔ +TAg

Les plasmides pBK-CMVΔ ainsi que pBS+α-crystalline et TAg ont d'abord été digérés avec les enzymes de restriction BamHI et EcoRI. Un total de 5 µg d'ADN plasmidique a été digéré dans un tampon de concentration de 50 mM de NaCl. La digestion a été préincubée 30 minutes avec BamHI seulement avant d'y ajouter l'enzyme EcoRI. Après cette digestion, les fragments désirés ont été chargés sur un gel d'agarose. Les fragments récupérés de 2,6 Kb pour TAg et de 4,3 Kb pour le vecteur ont été purifiés.

Suite à la purification du fragment TAg et du vecteur pBK-CMVΔ, les deux fragments ont été ligués pour former un plasmide possédant à la fois un gène pour immortaliser les cellules (gène TAg) et un gène pour procurer la résistance à la généticine (gène Néo). Pour cette ligation, le tampon de NEB (18 mM ATP), la ligase T₄ de Pharmacia, 5 µL du gène TAg et 3 µL du vecteur pBK-CMVΔ ont été utilisés. Les clones ont été sélectionnés et purifiés tel que mentionné dans la section 2.1.7.4. La représentation du plasmide pBK-CMVΔ + TAg se retrouve à la figure 8.

2.3.4 La transformation des cellules endométriales

Après une culture initiale de 7-10 jours, les cellules endométriales ont été récupérées avec une solution de dispase de concentration entre 0,6 et 2,4 U permettant de détacher les cellules du tapis de matrigel. Le tout fut incubé à 37°C pour permettre aux cellules de se détacher. Après leur isolation, 1,35 X 10⁵ cellules par puits ont été remis en culture, pendant environ 18 heures (1000 µL de la suspension cellulaire par puits dans une plaque de 24 puits en présence du milieu DMEM complet). Après cette culture de 18 heures, le milieu fut retiré et les cellules furent lavées doucement avec du PBS (saline). Par la suite, 800 µL de milieu sans sérum ni antibiotique a été ajouté aux cellules. Deux solutions (quantités sont ajustées pour une seule lipofection) ont été préparées:

-
- A: 2 µL ADN plasmidique (pBK-CMVΔ + TAg clone 3)
98 µL DMEM sans sérum

 - B: 20 µL de lipofectamine
80 µL DMEM sans sérum

Les deux solutions furent mélangées et laissées à incuber 45 minutes à la température de la pièce. Par la suite, 200 μ L du mélange a été ajouté aux cellules et 1 mL de milieu DMEM avec sérum et glutamine (sans antibiotique) a été ajouté par la suite. Le tout a été incubé pour différents temps. Dans notre cas, les temps d'incubation s'évaluaient de 4, 24 et 48 heures. Trois contrôles ont été inclus:

- Cellules et lipofectamine
- Cellules et ADN plasmidique
- Cellules seulement

Après le temps d'incubation, le milieu DMEM a été remplacé par du milieu DMEM complet. La culture fut maintenue pendant 7 jours selon la méthode décrite à la section 2.4.2.

2.3.5 La sélection des cellules immortalisées

2.3.5.1 Le traitement à la généticine (G-418)

La sélection des cellules immortalisées fut faite au moyen de traitement à la généticine (G-418). Le plasmide utilisé pour la lipofection, pBK-CMV Δ + Tag clone 3 possède le gène Néo, et permet de transmettre la résistance à la généticine (gène Néo) aux cellules l'ayant incorporé. Donc, après 7 jours de culture dans le DMEM complet, les cellules ont été traitées à la généticine. Le traitement dure jusqu'à ce que les cellules contrôles n'ayant pas été transformées meurent. Dans notre cas le traitement a duré environ 22 jours.

2.3.5.2 La séparation des clones

Pour s'assurer que la lignée cellulaire formée soit pure, 1 seule cellule doit être isolée du foyer de cellules en culture ayant résisté au traitement avec G-418. Pour ce faire, une dilution limitée des cellules récupérées du foyer de cellules fut redistribuée dans les puits d'une plaque de 96 puits de façon à avoir une seule cellule par puits. Par la suite, la plaque de 96 puits a été mise en culture jusqu'à ce que les cellules soient confluentes dans le puits. Après avoir atteint la confluence, les cellules ont été transférées dans des puits de

plus en plus grand jusqu'à ce que le nombre de cellules soient suffisant pour la congélation et pour réaliser les tests nécessaires. La culture fut augmentée de façon graduelle parce que les cellules en culture dans un espace trop grand ont une croissance plus difficile.

2.3.6 L'entretien des lignées de cellules immortalisées

Pour la culture des lignées cellulaires endométriales, à long terme ou pour une grosse quantité de cellules, les cellules ont été mises en culture dans une boîte de culture de capacité total de 200 mL. Le changement de milieu a été fait les lundis, mercredis et vendredis. Les lundis et mercredis, le milieu a été remplacé par 20 mL de milieu DMEM complet préalablement chauffé à 37°C. Par contre, le vendredi, 32 mL de milieu fut rajouté au lieu de 20 mL.

Lorsque les cellules venaient à confluence, une trypsinisation était nécessaire. Pour ce faire, le milieu a été retiré et gardé dans un tube stérile de 50 mL. Les cellules ont été lavées avec une solution saline pour enlever les traces de sérum. Par la suite, 5 mL de trypsine+EDTA (75 000 U) ont été ajoutés aux cellules. Les cellules sont demeurées dans cette solution jusqu'à ce qu'elles se détachent du fond de la boîte de culture. La solution de trypsine et les cellules ont été ajoutées au milieu de culture gardé dans le tube stérile de 50 mL. La suspension cellulaire a alors été centrifugée à 1 000 RPM/10 minutes (rotor GH 3,8 Beckman) et décantée. Les cellules ont été lavées avec du PBS ou du nouveau milieu pour être centrifugées à nouveau. Après quoi les cellules ont été resuspendues dans du milieu DMEM complet et remises en culture ou congelées à -70°C (voir l'annexe pour le protocole détaillé).

2.4 ÉTUDES DE L'EXPRESSION DE LIF BOVIN DANS DIFFÉRENTS TISSUS

2.4.1 La récolte de l'ARN provenant de différents tissus bovins

Les tissus bovins prélevés de la nécropsie ou de l'abattoir ont été gelés immédiatement dans l'azote liquide pour être entreposés à -70°C. Ceci est nécessaire afin d'éviter la dégradation de l'ARN par les RNAses. L'ARN total a été obtenu suite à

l'extraction d'environ 2 g de tissu dans 20 mL de solution dénaturante à base de guanidium-isothiocyanate (Solution D). Cette solution inhibe l'action des RNases. Le reste du tissu non utilisé est maintenu dans l'azote liquide en attendant d'être remis à -70°C. Le 2 g de tissus a été homogénéisé à l'aide d'un polytron (8 000 RPM) avant de procéder à l'extraction de l'ARN.

Après l'extraction de l'ARN total, la qualité et la quantité récupérées ont été évaluées. Pour en évaluer la qualité, 2-5 μL de la solution d'ARN a été chargé sur un gel d'agarose de 1% contenant de la formamide et de la formaldéhyde en présence de bromure d'éthidium (10 mg/mL). Le tout a migré à 90 volts pendant 1 1/2 heure à 3 heures. Les bandes d'ARN ribosomales 18S et 28S apparaissent lorsque l'ARN est de bonne qualité. La quantité d'ARN est évaluée par densitométrie à l'aide du spectrophotomètre à 260 nm où 1 D.O. est égale à 40 μg d'ARN /mL de diluant.

2.4.2 L'analyse de l'expression de LIF dans les différents tissus par RT-PCR

Une analyse par RT-PCR a été réalisée à partir des échantillons d'ARN totaux pour déterminer les tissus exprimant bLIF. La PCR a été utilisée à cause de sa grande sensibilité, puisque LIF est une molécule exprimée de façon relativement faible. Pour effectuer la RT, 1 μg d'ARN total de chaque tissu a été utilisé et mis en présence de l'amorce antisense bLIF/Exp.1 (tableau 2) avec l'enzyme de transcription inversée (SuperScript) pour permettre la formation du premier brin sens d'ADN complémentaire (ADNc). Par la suite, une amplification par PCR a été effectuée en utilisant 2 μL de la réaction de RT comme cible. Les amorces utilisées pour le premier PCR ont été Exp.A (sense) et Exp.1 (antisense) (tableau 2) avec la polymérase TAQ. Les conditions de température utilisées ont été de: 30 secondes à 95°C; 45 secondes à 68°C; 2 minutes à 72°C; le tout répété 40 fois. La confirmation (2^{ième} PCR) de ce PCR fut exécutée avec les amorces Exp.A (sense) et bLIF.6(bt) (antisense) (tableau 2) en utilisant 2 μL du 1^{er} PCR Exp.A/Exp.1. Les conditions de température et de polymérase demeurent les mêmes pour le PCR ancré. Les résultats du premier et second PCR sont visualisés sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (10 mg/mL).

2.5 ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GÈNE LIF BOVIN DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES PRIMAIRES (NON TRANSFORMÉES)

N.B. Cette partie a été effectuée avec une culture cellulaire contenant des cellules épithéliales ainsi qu'avec une culture de cellules stromales. Les cultures n'ont toutefois pas été analysées pour caractériser les types cellulaires.

2.5.1 La culture des cellules endométriales sous l'influence de stéroïdes

Les cellules ont été mises en culture sur un tapis de matrigel pour 10 jours. Pendant ce temps de culture, les cellules sont mises en présence de différents stéroïdes dont la progestérone et/ou l'oestrogène. Le milieu contrôle ne contenait aucun stéroïde. Ceci implique que le sérum ajouté au milieu de base (RPMI 1640) avait été désactivé au charbon pour éliminer les traces de stéroïdes (voir le protocole en détail en annexe). Le milieu E₂ consistait en un milieu contenant du sérum traité au charbon auquel 100 pg d'oestrogène (E₂) par mL de milieu a été ajouté. Le milieu P₄ contenait lui aussi du sérum traité au charbon auquel 10 ng de progestérone (P₄) par mL de milieu a été ajouté. Le dernier milieu E+P consistait du mélange des deux hormones. Les stéroïdes étaient présents à des concentrations différentes dans le milieu c'est-à-dire de 10 ng de P₄ par mL de milieu et de 10 pg de E₂ par mL de milieu et ce, toujours avec du sérum traité au charbon. Les concentrations d'hormones utilisées représentent des concentrations physiologiques. Les milieux ont été changés les lundis, mercredis et vendredis.

2.5.2 L'extraction de l'ARN à partir des cellules

Un total de 9 mL d'une solution de guanidium-isocyanate (solution D) a été répartie dans chaque puits de la plaque de 6 puits (1.5 mL/puits) puis une attente de 30 minutes d'incubation a été respectée pour permettre à la solution de faire éclater les cellules. Après quoi la solution devient très visqueuse à cause de la libération de l'ADN contenu dans les cellules. La solution des 6 puits a été récupérée à l'aide d'un pipetman muni d'un embout de 1 mL (bleu) et transférée dans un tube stérile de 50 mL. À cette solution, 9 mL de phénol acide, 900 µL d'acétate de sodium (d'une concentration de 2 M et à un pH 4) et 3,6 mL de chloroforme ont été ajoutés. Il est important de bien mélanger et de séparer également dans des tubes "loose cap" de 15 mL. Le reste du protocole

demeure le même que pour l'isolation d'ARN mentionné en annexe à l'exception des volumes utilisés. Pour resuspendre le culot après la première précipitation, un total de 400 μL de solution D par tube a été utilisé. Pour la seconde extraction, les volumes utilisés furent de 400 μL de phénol acide, 40 μL d'acétate de sodium et 160 μL de chloroforme. Pour resuspendre le culot 25-35 μL d' H_2O , traité contre les RNAses a, suffit.

N.B. Après le dix jours d'incubation, la culture cellulaire pouvait être congelée à -70°C où l'ARN pouvait en être extrait immédiatement.

N.B. Toujours garder le matériel à utiliser sur glace

2.5.3 Analyse de l'expression de bLIF par RT-PCR

L'analyse de l'expression de bLIF sous l'influence de différentes hormones à partir de l'ARN isolé des cellules a été faite avec l'aide de la technique de RT-PCR. Pour la réaction de transcription inverse (RT), les conditions sont décrites en page 117 de l'annexe. Un total de 1 μg d'ARN provenant de cellules épithéliales ou stromales, l'amorce bLIF/Exp.1 (tableau 2) et l'enzyme SuperScript ont été utilisés. Après cette RT, une réaction de PCR a été réalisée utilisant 2 μL de la RT comme cible, les amorces bLIF/Exp.A et bLIF/Exp.1 (tableau 2) ainsi que l'enzyme Taq. Les conditions de l'amplification sont les suivantes: 45 secondes à 95°C ; 30 secondes à 68°C ; 1 minute à 72°C . Ce cycle fut répété 25 et 30 fois pour cibler la portion exponentielle de la réaction de PCR. Ce dernier fut analysé sur un gel d'agarose de 1%.

Le gène GAPDH a été utilisé comme contrôle. Une quantité de 1 μg du même ARN a été utilisée et soumise à des conditions relativement similaires à celles utilisées pour le gène bLIF. Toutefois, les amorces utilisées demeurent spécifiques au gène GAPDH. L'amorce antisense utilisée pour le RT, fut l'amorce GAPDH.1 (tableau 2). Après la RT, l'amplification du gène fut exécutée avec 2 μL de la RT et les amorces GAPDH.A/GAPDH.1 (tableau 2). Les conditions de PCR varient quelque peu, soit de 45 secondes à 95°C ; 45 secondes 64°C ; 1 minute 30 secondes à 72°C . Cette séquence fut répétée 20 et 25 fois pour les mêmes raisons que pour l'amplification du gène bLIF.

2.5.4 Profil de l'expression de LIF selon les stéroïdes utilisés

Pour cette expérience, les conditions de culture, d'extraction d'ARN et de RT-PCR sont les mêmes que pour les sections 2.5.1, 2.5.2 et 2.5.3. Toutefois, la différence se situe aux niveaux des concentrations de progestérone auxquelles les cellules épithéliales ont été soumises. Les concentrations utilisées ont varié de 0 à 1000 ng de progestérone par mL de milieu RPMI 1640 (en augmentant de 10 ng à chaque milieu).

2.6 ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GÈNE LIF BOVIN DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES IMMORTALISÉES

2.6.1 La culture des cellules endométriales sous l'influence de stéroïdes

La façon de procéder est la même que celle décrite à la section 2.5.1, exception faite de l'utilisation des lignées cellulaires endométriales immortalisées.

2.6.2 L'extraction de l'ARN à partir des cellules

La façon de procéder est la même que celle décrite à la section 2.5.2, exception faite de l'utilisation des lignées cellulaires endométriales immortalisées.

2.6.3 Analyse de l'expression de bLIF par RT-PCR

La façon de procéder est la même que celle décrite à la section 2.5.3, exception faite de l'utilisation des lignées cellulaires endométriales immortalisées.

2.6.4 Profil de l'expression de LIF selon les stéroïdes utilisés

La façon de procéder est la même que celle décrite à la section 2.5.4, exception faite de l'utilisation des lignées cellulaires endométriales immortalisées.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 CLONAGE DE LA SÉQUENCE GÉNOMIQUE DU GÈNE LIF BOVIN

3.1.1 Analyse Southern de l'ADN génomique

Nous avons généré une sonde spécifique à LIF bovin grâce à l'amplification d'un fragment par PCR à partir de l'ADN génomique et des amorces LIF.E et LIF.5. Les résultats de cette amplification montrent une bande d'environ 1.1 Kb appelé bLIF E-5 (figure 1). L'analyse de la séquence de LIF E-5 a permis de déterminer que cette dernière correspondait à une partie de la séquence du gène LIF bovin. Sa localisation sur le gène se trouve illustrée à la figure 3 démontrant la stratégie de clonage. Ce fragment inclus le deuxième intron du gène LIF toutefois, le fragment s'étend des bases 76 à 582 lorsque l'intron II est exclus.

L'analyse de l'ADN génomique fut alors exécutée. La figure 2 montre un autoradiogramme de l'analyse Southern de l'ADN génomique prédigéré avec différents enzymes de restriction. Les enzymes de restriction ayant servi pour la digestion de l'ADN génomique sont les suivants: BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, SacI, Sal I, SmaI, XbaI et XhoI. Dans le puits correspondant à la digestion avec BamHI, une bande d'environ 4 Kb apparaît. Une digestion d'une grande quantité d'ADN génomique a été effectuée pour permettre la création d'une banque génomique de taille prédéterminée.

3.1.2 L'amplification du gène LIF par PCR à partir de la banque génomique

La localisation des fragments LIF L/11B, LIF H/T₃ et LIF Exp.A/7 sur le gène LIF a été identifiée à la figure 3. Le fragment LIF L/11B a été obtenu par l'amplification du fragment d'ADN génomique de 4 Kb ligué sur elle-même. Le fragment de 162 pb s'étend de l'amorce bLIF/Exp.A en 5' du gène jusqu'à l'amorce bLIF.11B en 3' du gène en passant par le site de ligation BamHI situé aux extrémités du fragment de 4 Kb.

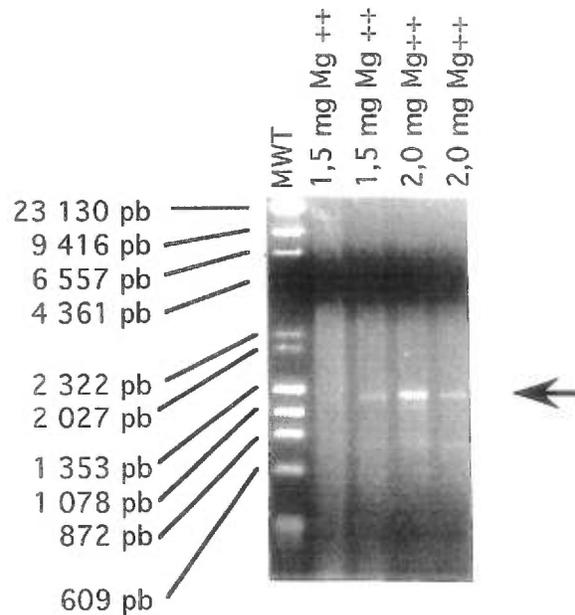


Figure 1: **Résultats de la première amplification du gène LIF bovin.** L'amplification a été effectuée à partir de l'ADN génomique bovin et les amorces LIF.E et LIF.5 (tableau 2). Ces dernières sont consensus avec plusieurs espèces. Les PCR ont été effectuées en duplicata utilisant deux concentrations différentes de Mg^{++} dans le tampon de PCR soit une concentration de 1,5 et 2 mg. L'enzyme Tth a été utilisée pour permettre la polymérisation du fragment d'ADN. L'échelle de poids moléculaire utilisée est une échelle vendue commercialement. Cette dernière est constituée du phage lambda digéré avec l'enzyme de restriction Hind III et de ϕ X-174 digéré avec l'enzyme de restriction Hae III. Les fragments sont séparés sur un gel d'agarose de 1%.

La flèche indique un fragment d'environ 1,1 Kb.

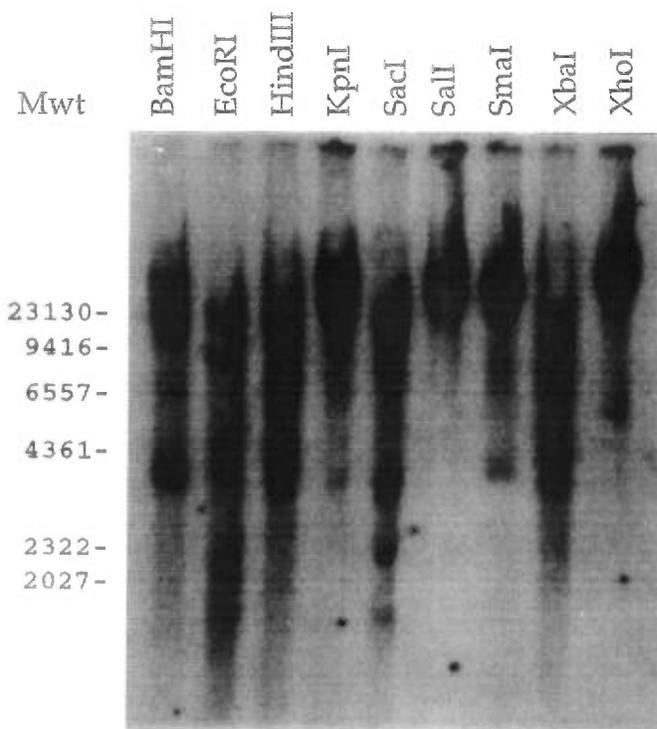


Figure 2: **Analyse Southern de l'ADN génomique bovine.** 10 μ g d'ADN génomique a été digéré avec différentes enzymes de restriction et le tout a été chargé sur un gel d'agarose 0,8%. Après la migration, l'ADN a été transféré sur une membrane de nylon. Cette membrane fut traitée au U.V. pour permettre à l'ADN de s'y fixer. Une sonde (LIF E-5 voir fig.2) de 0,6 Kb a été marquée avec l'isotope radioactif ^{32}P - α -dCTP. Cette dernière a été utilisée pour hybrider la membrane traitée aux U.V. L'hybridation et les lavages ont été effectués à 65°C. La digestion avec l'enzyme BamHI montre une bande d'environ 4 Kb. Les fragments de grandeur située entre 3,6 et 4,5 Kb ont été récupérés et clonés pour permettre l'amplification du gène LIF.

LA STRATÉGIE DE CLONAGE DU GÈNE LIF BOVIN

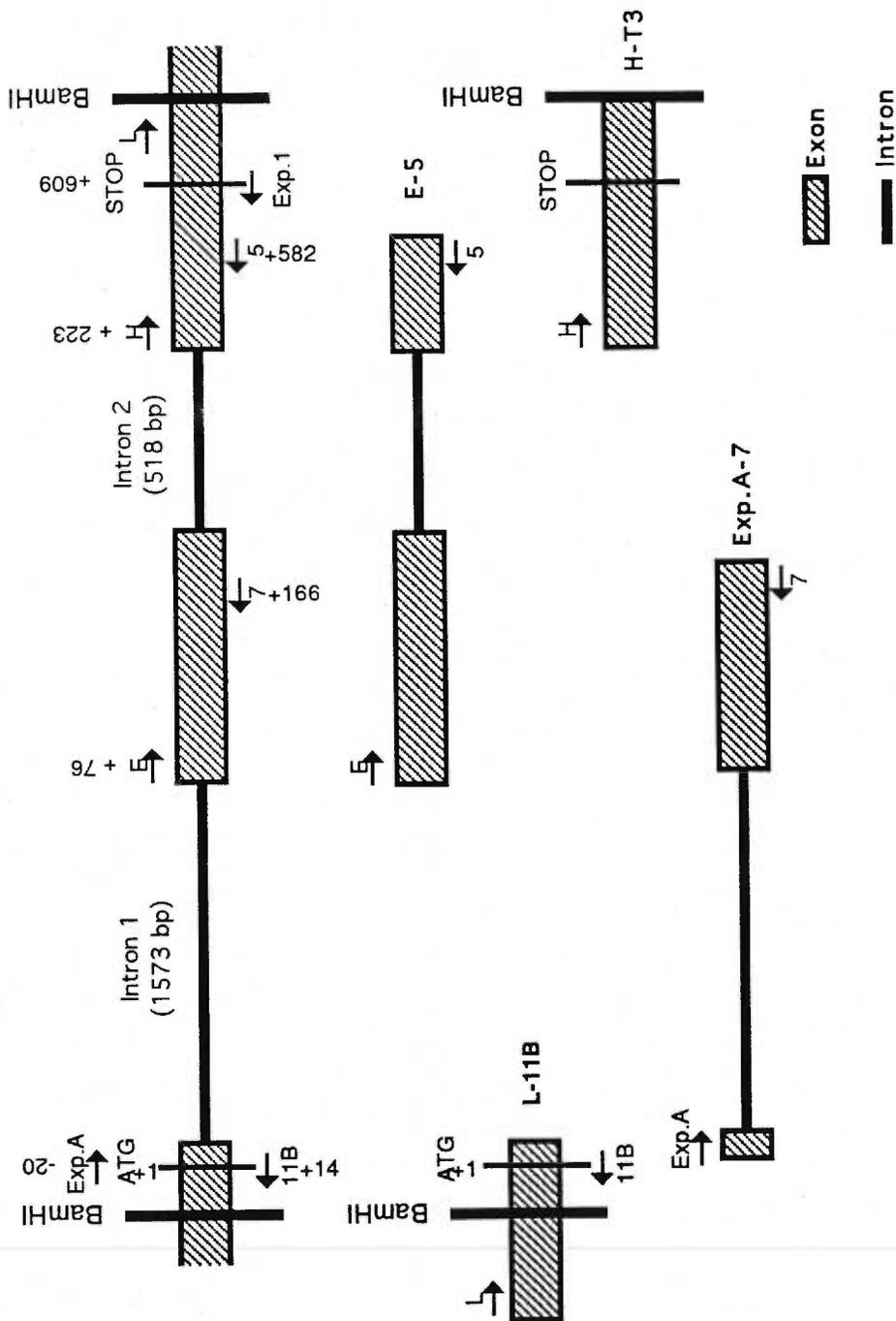


Figure 3:

La stratégie de clonage du gène LIF bovin. Le fragment LIF E/5 (1024 pb) a été amplifié à l'aide d'amorces non spécifiques mais consensus pour différentes espèces. Les autres amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène bLIF ont été conçues après avoir obtenu des séquences bovines. Le fragment H/T3 (1 Kb) a été amplifié, à partir du fragment génomique de 4 Kb provenant de la digestion avec BamHI, pour obtenir le bout 3'. Pour obtenir le fragment L/11B (162 pb) nous avons amplifié à partir du fragment de 4 Kb ligué sur lui-même pour ainsi obtenir le bout 5'. Le fragment Exp.A/7 (environ 1 400pb) a été amplifié mais pas sous-cloné. Les amorces sens sont identifiées par des lettres tandis que les amorces antisens sont désignées par des chiffres.

Le fragment LIF H/T₃, pour sa part, a été obtenu par l'amplification du fragment de 4 Kb incorporée dans un vecteur (BSKS (+)) utilisant les amorces LIF.H et T₃. Ce fragment LIF H/T₃ de longueur approximative de 1 Kb se situe entre la base 223 (excluant les introns) et la fin du fragment génomique de 4 Kb.

Le premier intron du gène LIF se trouve à être inclus dans le fragment LIF Exp.A/7 dont l'amplification génère un fragment d'environ 1,8 Kb. Malgré que le fragment soit amplifié, ce dernier n'a pas été sous-cloné puisque la séquence se trouvait déjà dans GenBank (D50337). La séquence génomique n'était donc plus nécessaire à déterminer. Sa localisation sur le gène LIF est toutefois visible à la figure 3.

3.1.3 Amplification de l'extrémité 3' non codant (RACE 3')

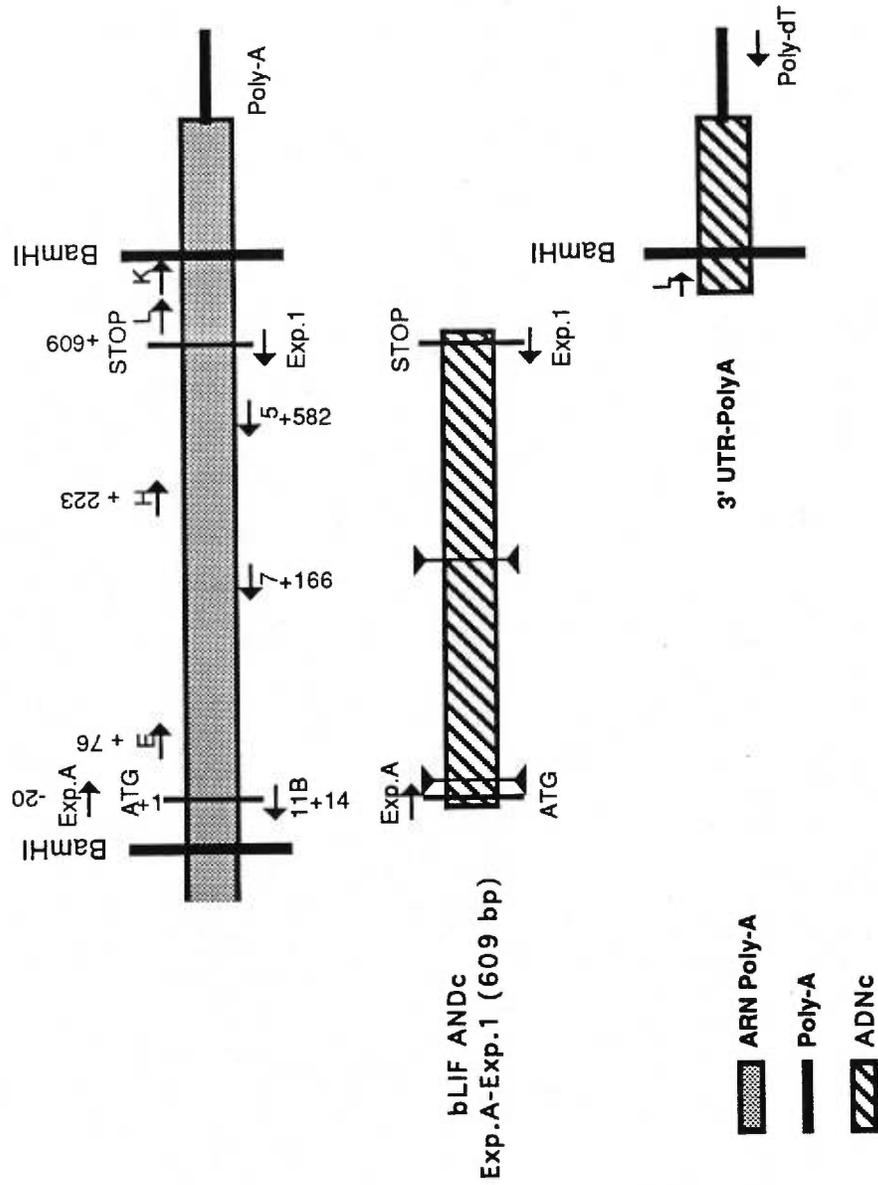
Plusieurs fragments pour la portion 3' non-codant ont été obtenus à partir d'ARN poly A isolé soit des cellules endométriales immortalisées ou du poumon. Le fragment le plus long a été isolé cloné et séquencé. Nous avons déterminé 621 pb de plus en 3' que la séquence génomique déterminée par l'équipe de Kudo (GenBank D50337; figure 4). La séquence de la partie non-codante en 3' a permis de déterminer l'existence de quelques sites de polyadénylation potentiels. Les différents signaux potentiels de polyadénylation ont été identifiés à la figure 5.

3.2 CLONAGE DE LA SÉQUENCE EXPRIMÉE DE LIF BOVIN (ADNc)

3.2.1 La séquence ADNc de bLIF

La séquence d'ADNc de 609 pb a été obtenue en effectuant un RT-PCR utilisant l'ARN isolé du poumon, des cellules endométriales primaires ou des cellules immortalisées avec l'amorce Exp.1 pour le RT suivi d'un PCR incluant les amorces Exp.A et Exp.1. La séquence complète provenant des fragments amplifiés se retrouve à la figure 5. La localisation des différents fragments amplifiés se retrouve à la figure 4. En comparant la séquence d'ADNc avec la séquence génomique, il est possible de déterminer la position de deux introns. Le premier se situe après la base 19 de la séquence codante tandis que le second se situe après la base 198.

LA STRATÉGIE DE CLONAGE DE L'ADNC À PARTIR DE L'ARN poly A



La stratégie de clonage de l'ADNc du gène LIF bovin. L'ARN poly A utilisé a été isolé à partir du poumon et des cellules endométriales. L'amplification de la partie codante du gène LIF bovin a été effectuée à l'aide des amorces LIF Exp.A et LIF Exp.1 pour obtenir un fragment de 609 pb. L'amplification de la partie 3' non-traduite (3' UTR) a été effectuée à l'aide des amorces bLIF.L et d'une amorce construite à la fois pour permettre à l'amorce de se fixer à la cible et de créer des sites de restriction. Les amorces sens sont identifiées par des lettres tandis que les amorces antisens sont désignées par des chiffres.

Figure 4:

-146 GGATCCCTGCTAAATATAGCTGTTTCTCTCTCTCTTACAACACAGGCTCCAGTATATAAATCAGGCAAATTC
-74 CCCATTTGAGCATGAACCTCTGAAAACAGCCGGCATCTAAGGTCTCCTTCAAGGCCCTCTGGAGTGCAGCCATA

1 ATGAAGGTCTTTGGCGGCAGGAGTTGTGCCCTTGCTGCTGGTTCTCCACTGGAAACACGGGGCCGGGAGCCCCCTT
1 MetLysValLeuAlaAlaGlyValValProLeuLeuLeuValLeuHisTrpLysHisGlyAlaGlySerProLeu

76 CCCATCACCCCGGTCAACGCCACCTGTGCCACCCGCCATCCCTGTCCCAGCAACCTCATGAACCAGATCAGAAAC
25 ProIleThrProValAsnAlaThrCysAlaThrArgHisProCysProSerAsnLeuMetAsnGlnIleArgAsn

151 CAGCTGGGCAACTCAACAGCAGTGCCAACAGCCTCTTTATCCTCTATTACCACGGCCAGGGGGAGCCCTTCCCC
50 GlnLeuGlyGlnLeuAsnSerSerAlaAsnSerLeuPheIleLeuTyrTyrThrAlaGlnGlyGluProPhePro

226 AACAACTGGACAAGCTGTGCAGCCCCAACGTGACTGACTTCCCGCCCTTCCACGCCAACCGGACGGAGAAGGCC
75 AsnAsnLeuAspLysLeuCysSerProAsnValThrAspPheProProPheHisAlaAsnAlaThrGluLysAla

301 CGGCTGGTGGAGCTGTACCGCATCATCGCGTACCTGGGCGCCTCCCTGGGCAACATCACGAGAGACCAGAAGGTC
100 ArgLeuValGluLeuTyrArgIleIleAlaTyrLeuGlyAlaSerLeuGlyAsnIleThrArgAspGlnLysVal

376 CTCAACCCCTACGCCACGGCCTGCACAGCAAGCTGAGCACCACGGCCGACGCTCCTGCCGGGTCTGCTCAGCAAC
125 LeuAsnProTyrAlaHisGlyLeuHisSerLysLeuSerThrThrAlaAspValLeuArgGlyLeuLeuSerAsn

451 GTGCTCTGCCGCTTGTGCAGCAAGTACCACGTGAGCCACGTGGACGTGACCTACGGCCCCGACACCTCGGGCAAG
150 ValLeuCysArgLeuCysSerLysTyrHisValSerHisValAspValThrTyrGlyProAspThrSerGlyLys

526 GACGTCTTCCAGAAGAAGAAGCTGGGCTGTGAGCTCCTGGGGAAGTACAAGCAGGTCATCGCCGTGCTGGCCAG
175 AspValPheGlnLysLysLysLeuGlyCysGlnLeuLeuGlyLysTyrLysGlnValIleAlaValLeuAlaGln

601 GCCTTCTGAACGGGAGGTCTTAGATAGTAGGGACTCTCCAACCTGCAGCCGTGGCCAGAGCACTGCCAGACCCG
200 AlaPhe***

676 AGTAGGGGCGCTGGCAGACCCCTGAGGGGTTCCTGGCCGCTCCACTCCCCTCCAGGGTGGGCGCCACGAAGCC
751 GAGCAGAGCCAGAACTCCCAGAGGCAGAACCTATACGTGGTGCCAACTAGAAAGGAAGGCCCCCTTCTTCTGGG
826 AGACTACAGCCGGGCACGCAGTGTGGGCTGGAGTTTGGCCCTGACTCATCCCCTCAGCCAGGCTCTTGTGAG
901 CAAACCCCGAAAAGTTGTCTTGGCGACCCTGACCACGGGGTGAGACAGCAGGGGTGCGGGGCACTAACC CGCGAC
976 CCCCCAGCAGAAATGACCACCATCAGTGCCTTGGCTGACCTTGAAGGTCTGGTTGGAGCTCAGGCAGCCTGGAGG
1051 GGCTCGATCCGGAAGGACCCCTTGGCTCCTACAGGTATGGCGAGTTGGAAGTCTAGAACGGGAGCTGTGGTTGA
1126 GATGCTGCCTTGTCTGGGCAAGACTGGGGAGTTTCAGGCCTATAGCTCTCAGGTGGAAGGTTCCAGAAGGAGGCCA
1201 CATGGCCTCCAGGCTCTCGGGGAGGCAGAGAGAGGCCACATGTAGGCCGGGAAGGAAGAGAGGCCCTTGAAGT
1276 CTTGACGGGCTCCCCTTCTTGGACCCAAAGTCTGTCTGCTGCCATCCTTGTGCGCCGGGGTCTAGGGACTGGAC
1351 CTGGAGGCGGGGTGTCTGGGGCGGGCAGGTTGCAAAGTCAGGTGAGGAGGTTCTAAGGGGATCCAGAGTCTTGT
1426 GGGCGAGGGTGTGCGGATGGAGTAGGTCAGAGTGGCAGCTCCCGTCTGAGGCCACCCAGGCCCGGTGAGGTCAC
1501 ACAGAGGTACGCCGGGGCACCAGAGGCCATCTGTGCTGGTTCCCTGGAGCAGGGGGACGGTGGGAGTTGAGGTC
1576 AGGGTCTCAGAAGCCTGAGAGCCAAGAGTGCTGTGCTGACTCAGCATGATGTCTATTTATTTTGGATGCCCT
1651 ATTTATATTAACCTTATTGGTGCTTCAAATGGC

ATG Codon d'initiation ou d'arrêt TAC Site de restriction BamHI
— Site potentiel du signal de polyadénylation Limite intron/exon

Figure 5: La séquence d'ADN complémentaire du gène LIF bovin. La séquence de l'ADNc a été obtenue par RT-PCR en utilisant l'amorce bLIF/Exp.1 comme amorce antisense pour la transcription inverse (RT) et les amorces Exp.A et Exp.1 pour le PCR. L'ARN utilisé pour la réaction de RT a été isolé de poumon et des cellules endométriales en culture. Un fragment de 609 pb a été généré. En comparant la séquence codante avec les séquences génomiques disponibles, nous avons localisé deux introns. Le premier se situe après la base 19 et le second se trouve après la base 198.

3.2.2 La séquence du gène bLIF

Les figures 6, 7 ainsi que le tableau 3 représentent la comparaison des séquences nucléiques et protéiques de différentes espèces aux séquences bovines que nous avons obtenues. La comparaison indique des différences plus marquées entre les séquences bovines et murines.

3.2.3 Comparaison des séquences bLIF connues

La comparaison des séquences génomiques de l'équipe de Kudo (GenBank D50337) et de celle de Piedrahita *et al.* (1996; GenBank U63311; en enlevant les introns pour permettre la comparaison avec notre séquence) avec notre séquence ADNc (GenBank U65394) a permis de déterminer quelques différences au niveau des séquences. En comparant la séquence codante pour toutes les séquences connues, 8 acides nucléiques ne sont pas identiques pour toutes les séquences. Ces acides nucléiques sont les bases 34, 287, 393, 706, 884, 950, 1037 et 1038. Toutefois si on compare notre séquence aux 2 autres, nous pouvons identifier deux endroits où notre séquence ne correspond pas à au moins une autre séquence c'est à dire à la bases 287 et 706. À la base 287, l'acide nucléique G des deux autres séquences est remplacé par un C. Pour ce qui est de la base 706, il manque un acide nucléique par rapport aux deux autres séquences.

3.3 CRÉATION DE LIGNÉES CELLULAIRES ENDOMÉTRIALES BOVINES

3.3.1 Cartographie des plasmides utilisés

Le plasmide construit pour l'immortalisation des cellules endométriales possède à la fois le gène de résistance à la néomycine (Néo) et le gène TAg du virus SV40 (figure 8). Les vecteurs pBK-CMV et pBK α -crystalline ne possèdent pas ces deux gènes à la fois.

		10	20	30	40	50
Bovine	1	ATGAAGGTCT	TGGCGGCAGG	AGTTGTGCCC	TTGCTGCTGG	TTCTC---CA
Humaine	1	C.....T...G----
Porcine	1	C.....G----
Ovine	1	...T.AAGA	.CTT...GG.	..GA..CGTG	CCCC.....C	.GG..TTG..
Murine	1C.....	GA.....	..A.....C	.GG.TCTG..
		60	70	80	90	100
Bovine	51	CTGGAAACAC	GGGGCCGGGA	GCCCCCTTCC	CATCACCCCG	GTCAACGCCA
Humaine	51TG....C..T
Porcine	51A....T.T..TT....
Ovine	51C.G....A..C
Murine	51A....T....T	..A..T....
		110	120	130	140	150
Bovine	101	CCTGTGCCAC	CCGCCATCCC	TGTCCCAGCA	ACCTCATGAA	CCAGATCAGA
Humaine	101T	A.....C..A	...A..A..G
Porcine	101	A..T..C..A	...A.....AG
Ovine	101	...CAA...	A.A..C..A	..C.....GG
Murine	101T	A.....C..A	..C.A.G...AG
		160	170	180	190	200
Bovine	151	AACCAGCTGG	GACAACTCAA	CAGCAGTGCC	AACAGCCTCT	TTATCCTCTA
Humaine	151	.G...A....	C...G....	TG.....	..TGC.....	...T.....
Porcine	151	CG..CG....GC.....	...T.....
Ovine	151	.G.....	C...G....	TG...C....	...GC.....	...T.....
Murine	151	..T..A....	C...G....	TG...C...	..TGCT....	.C..TTC...
		210	220	230	240	250
Bovine	201	TTACACGGCC	CAGGGGGAGC	CCTTCCCCAA	CAACCTGGAC	AAGCTGTGCA
Humaine	201A...G.....A..TG
Porcine	201	C.....A...A..T....	...T....TG
Ovine	201A...	..A.....	.G.....G
Murine	201A..T	..A..N....	.G..T....G....AA..TG
		260	270	280	290	300
Bovine	251	GCCCCAACGT	GACTGACTTC	CCGCCCTTCC	ACGCCAACGC	GACGGAGAAG
Humaine	251G.....G	C.....
Porcine	251CA.....G	C..C.....
Ovine	251T..	...G.....GC.....G	C.....
Murine	251	CG..T...A.	...A.....	..AT.T...	.T.G.....G	...A.....
		310	320	330	340	350
Bovine	301	GCCCCGGCTGG	TGGAGCTGTA	CCGCATCATC	GCGTACCTGG	GCGCCTCCCT
Humaine	301	...AA.....AG..	.T.....T.	..A.....
Porcine	301C.....T.
Ovine	301	.T.A.....G.G	..C.....T.	..A..G....
Murine	301	A..AA.T...	T..G..GG..	..A.....A

		360	370	380	390	400
Bovine	351	GGGCAACATC	ACGAGAGACC	AGAAGGTCCT	CAACCCCTAC	GCCCAGGGCC
Humaine	351CC.G....A....AGTTCA...
Porcine	351C.G....	.A.G.AG...	...T..TGGT	..TGT.AA..
Ovine	351CC.G....AC...ACG	..G..CA...
Murine	351	.AC...T...	..CC.G....	G.....ACT	...GT.A...
		410	420	430	440	450
Bovine	401	TGCACAGCAA	GCTGAGCACC	ACGGCCGACG	TCCTGCGGGG	TCTGCTCAGC
Humaine	401	.C.....	...C.A.G..	..C.....AA..	C..C..T...
Porcine	401TC...A.G..G...A	G.A...A..	C..C.....
Ovine	401	A..C.A.G..G...A	CG.....	C.....T...
Murine	401	.C..GGT...	...C.ATG.T	..TATA....	..A..A....	C..C.....
		460	470	480	490	500
Bovine	451	AACGTGCTCT	GCCGCTTG TG	CAGCAAGTAC	CACGTGAGCC	ACGTGGACGT
Humaine	451C....G...	.T.....
Porcine	451	..T.....C....	..A.....G...	.T.....T..
Ovine	451G.C....G...
Murine	451	..T.....T.TC....	..A.....	.GT...G...T..
		510	520	530	540	550
Bovine	501	GACCTACGGC	CCCGACACCT	CGGGCAAGGA	CGTCTTCCAG	AAGAAGAAGC
Humaine	501T.....T....	T.....
Porcine	501	.G.....
Ovine	501	.G...T...	..G.....
Murine	501	.C.ACCT.T.CA..	.T.A...A..	A.C.....A	.G...A...T
		560	570	580	590	600
Bovine	551	TGGGCTGTCA	GCTCCTGGGG	AAGTACAAGC	AGGTCATCGC	CGTGCTGGCC
Humaine	551	A.....T....	..A.....T.....
Porcine	551T....T.	T....TAG
Ovine	551	...G.....	...G.....A	..A.....G..T....G
Murine	551	...T..C..	...T.....	.CA.....	.A....AAG	T...G...T.
		610				
Bovine	601	CAGGCCTTCT	AG			
Humaine	601			
Porcine	601					
Ovine	601			
Murine	601			

Figure 6: La comparaison de la séquence d'ADNc de différentes espèces. Les séquences d'ADNc bovine, humaine, porcine, ovine et murine ont été comparées et la séquence consensus a été identifiée par "." et la séquence non-consensus a été identifiée par l'acide nucléique approprié à la séquence.

	10	20	30	40	50
Bovine	1 MKVLAAGVVP	LLL-VLHWKH	GAGSPLPITP	VNATCATRHP	C <input checked="" type="checkbox"/> SNLMNQIR
Humaine	1 MKVLAAGVVP	LLL-VLHWKH	GAGSPLPITP	VNATCAIRHP	CHNLMNQIR
Porcine	1 MKVLAAGVVP	LLL-VLHWKH	GAGSPLSITP	VNATCATRHP	CHSNLMNQIK
Ovine	1 MKILAAGVVP	LLL-VLHWKP	GAGSPLPINP	VNATCNTHHP	C <input checked="" type="checkbox"/> SNLMSQIR
Murine	1 MKVLAAGIVP	LLLVLHWKH	GAGSPLPITP	VNATCAIRHP	CHGNLMNQIK
	60	70	80	90	100
Bovine	51 NQL <input checked="" type="checkbox"/> QLN <input checked="" type="checkbox"/> SA	NLFILYYTA	QGEPPFNLLD	KL <input checked="" type="checkbox"/> PNVVTD	PPFHAN <input checked="" type="checkbox"/> TEK
Humaine	51 SQAQLNGSA	NALFILYYTA	QGEPPFNLLD	KLCGPNVTD	PPFHANGTEK
Porcine	51 NQLAHVNSSA	NALFILYYTA	QGEPPFNLLD	KLCGPNVTNF	PPFHANGTEK
Ovine	51 SQAQLNGTA	NALFILYYTA	QGEPPFNLLD	KLCGPNVTD	PPFPNGTEK
Murine	51 NQAQLNGSA	NALFISYYTA	QGEPPFNVE	KLCAPNMTDF	PSFHGNGTEK
	110	120	130	140	150
Bovine	101 ARLVELYRI <input checked="" type="checkbox"/>	AYLGASLGN	TRDQKVLNP <input checked="" type="checkbox"/>	A <input checked="" type="checkbox"/> LHSKI <input checked="" type="checkbox"/>	TADVLRGLLS
Humaine	101 AKLVELYRIV	VYLGTSLGN	TRDQKILNPS	ALSLHSKLNA	TADILRGLLS
Porcine	101 ARLVELYRII	AYLGASLGN	TRDQRSINPG	AVNLHSKLNA	TADSMRGLLS
Ovine	101 VRLVELYRIV	AYLGTALGN	TRDQKTLNPT	A <input checked="" type="checkbox"/> SLHSKLNA	TADTLRGLLS
Murine	101 TKLVELYRMV	AYLSASLTNI	TRDQKVLNPT	AVSLQVKLNA	TIDVMRGLLS
	160	170	180	190	200
Bovine	151 NVLCRLCSKY	HVGHVDM <input checked="" type="checkbox"/> YG	PDTSGKDVFO	KKKLGQLLG	KYKQVI AVLA
Humaine	151 NVLCRLCSKY	HVGHVDM <input checked="" type="checkbox"/> YG	PDTSGKDVFO	KKKLGQLLG	KYKQII AVLA
Porcine	151 NVLCRLCNKY	HVAHV DVAYG	PDTSGKDVFO	KKKLGQLLG	KYKQVISVLA
Ovine	151 NVLCRLCSKY	HVAHV DVAYG	PDTSGKDVFO	KKKLGQLLG	KYKQVM AVLA
Murine	151 NVLCRLCNKY	RVGHV DVPPV	PDHSDKEAFQ	RKKLGQLLG	TYKQVISVVV

210

Bovine	201 QAF*
Humaine	201 QAF*
Porcine	201 RAF*
Ovine	201 QAF*
Murine	201 QAF*

Changements conservés

Changements non conservés

Figure 7: La comparaison de la séquence protéique de LIF de différentes espèces. Les séquences protéique bovine, humaine, porcine, ovine et murine ont été comparées et la séquence consensus a été ombragée. La comparaison de la séquence bovine avec la séquence consensus a permis de démontrer la différence de 14 acides aminés. De ces 14 acides aminés, 11 sont des mutations conservées tandis que trois sont des changements non-conservés. De ces trois changements non-conservés, deux montrent une homologie avec au moins une autre espèce.

A) Pourcentage d'identité entre les séquences
d'acides nucléiques

	Bovine	Humaine	Porcine	Ovine	Murine
Bovine	100	85,5	87,6	86,5	77,6
Humaine		100	88,5	89,5	81
Porcine			100	85,5	79,3
Ovine				100	77,6
Murine					100

B) Pourcentage d'identité entre les séquences
d'acides aminés

	Bovine	Humaine	Porcine	Ovine	Murine
Bovine	100	89,1	88,1	85,6	76,8
Humaine		100	87,1	88,1	79,8
Porcine			100	84,2	77,9
Ovine				100	74,4
Murine					100

Tableau 3: **Tableau comparatif représentant le pourcentage d'identité de la séquence nucléotidique et protéique de différentes espèces. Les espèces étudiées sont les espèces bovine, humaine, porcine, ovine et murine.**

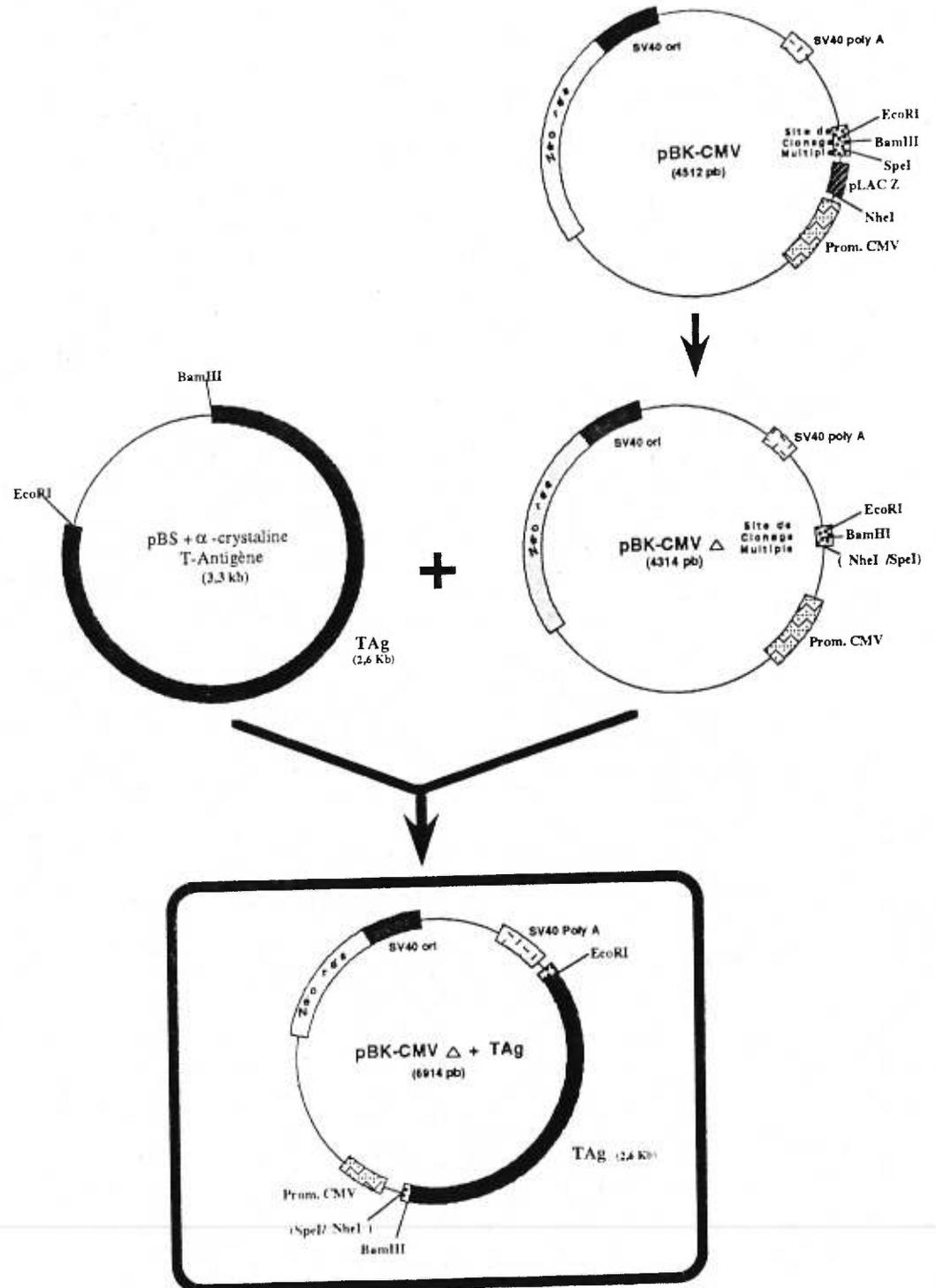


Figure 8 : Schéma représentant la construction du plasmide utilisé pour l'immortalisation des cellules endométriales.

3.3.2 L'utilisation de différentes concentrations de G-418

Différentes concentrations de G-418 variant entre 0 et 800 µg/ml ont été ajoutées à des cultures de cellules non-transformées (cellules primaires). Après 9 jours de traitement, une concentration de 50 µg/ml a suffi à éliminer toutes les cellules primaires en culture. Par contre, la concentration de 200 µg/ml a été choisie pour éviter de garder des cellules primaires plus résistantes en culture avec les cellules transformées (qui possèdent le plasmide pBK CMV Δ + TAg). Ainsi pour la durée du projet, les traitements de G-418 infligés aux cellules immortalisées furent de 200 µg/ml.

Des cellules non-transformées (cellules contrôles) ont été mises en culture en même temps que les cellules traitées avec le plasmide et le G-418 a été utilisé jusqu'à ce que les cellules contrôles soient toutes mortes. Ainsi, lors de l'augmentation de la colonie de cellules sélectionnées, le G-418 n'a pas été utilisé pour éviter de ralentir le processus. Par contre, avant d'utiliser les lignées pour la congélation ou les différentes études, nous avons exposé ces dernières à la G-418 pour environ deux semaines. Encore une fois pour être certains que les cellules utilisés possédaient toujours les gènes Néo et TAg.

3.3.3 La transformation des cellules endométriales

Les différentes cultures cellulaires des cellules immortalisées se sont comportées de façon différentes. En effet, certaines lignées possédaient plusieurs foyers de cellules et d'autres en possédaient moins. Les cellules en confluence sont demeurées plus rondes et se sont étendues moins que les cellules fraîchement ensemencées. Le temps requis pour atteindre cette confluence dépendait non seulement de la concentration initiale mise en culture, mais également de la vitesse de croissance des différentes lignées. Certaines lignées possédaient beaucoup de granules à l'intérieur du noyau et du cytoplasme. La lignée Endo 8,2 est montrée à la figure 8a.

3.4 ÉTUDES DE L'EXPRESSION DE LIF BOVIN DANS DIFFÉRENTS TISSUS

La figure 9 montre l'expression de bLIF dans différents tissus bovins par l'utilisation de la méthode du RT-PCR. La réaction de transcription inverse a été effectuée

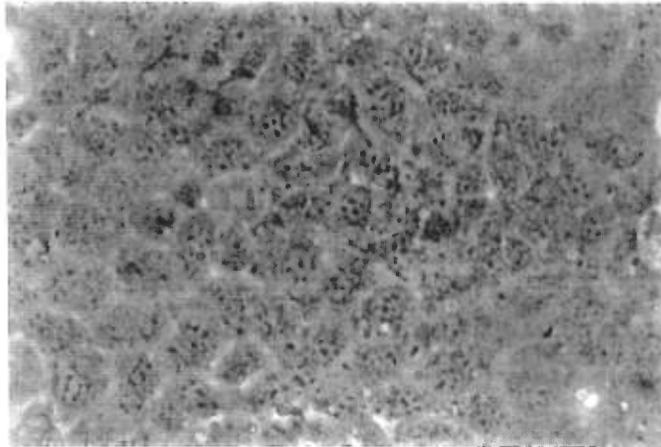
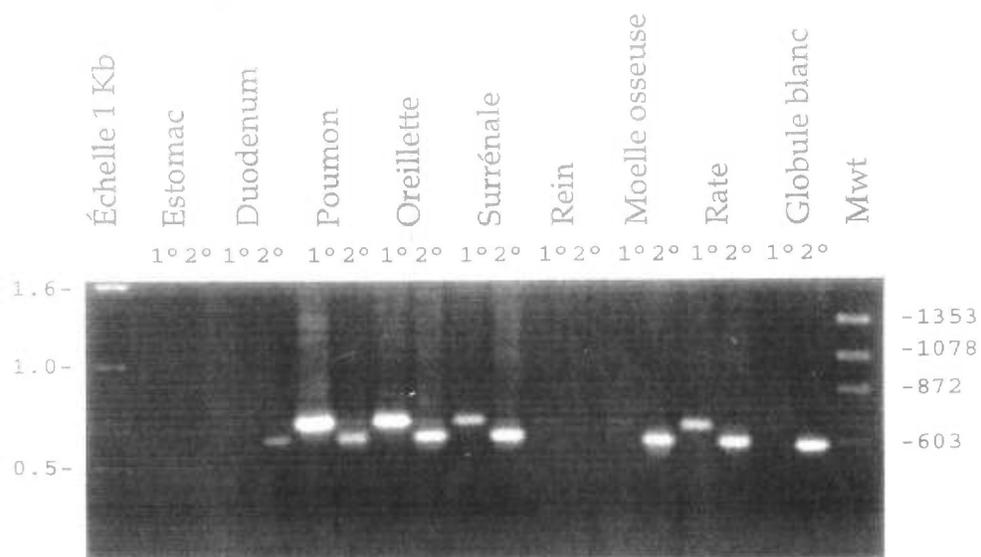


Figure 8a : **Photo représentant une culture de la lignée Endo 8,2 des cellules endométriales immortalisées.** La photo a été prise à partir d'une culture de la lignée cellulaire endométriale immortalisée à l'aide d'un plasmide possédant le gène TAg. La lignée cellulaire est identifiée comme Endo 8,2. Les cellules avaient atteint la confluence. Les cellules représentées sur la photos sont amplifiées 400 fois.

(A) Tissus non reproducteurs



(B) Tissus reproducteurs

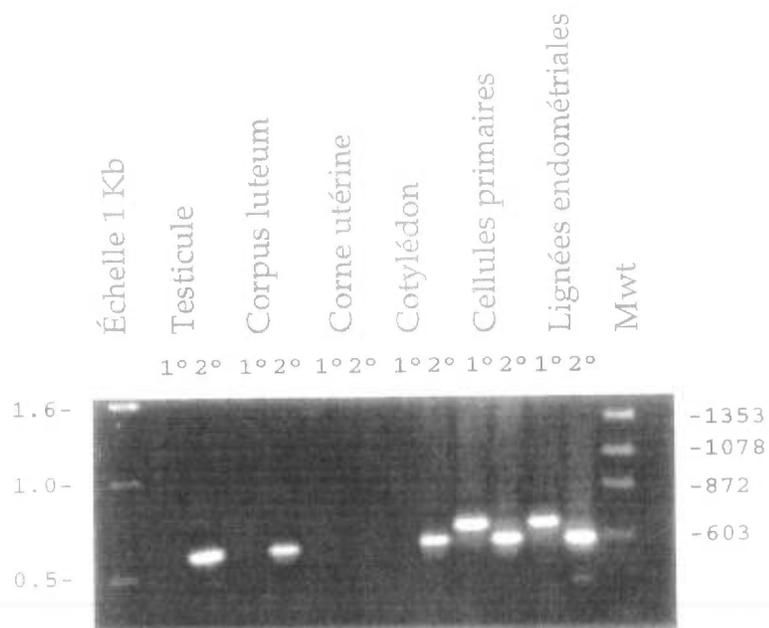


Figure 9: **Analyse de l'expression de bLIF par RT-PCR.** L'ARN total isolé de différents tissus bovins a été transcrit par transcription inversée en présence de l'amorce antisense Exp.1 et de l'enzyme de transcription inverse (SuperScript de Gibco/BRL). Le premier PCR a été exécuté à l'aide des amorces LIF Exp.A et LIF Exp.1 pour donner un fragment de 633 pb. Un second PCR (à partir du premier) a été exécuté à l'aide des amorces LIF Exp.A et bLIF.6(bt) pour donner un fragment de 557 pb. Les conditions de l'amplification étaient de 30 secondes à 95°C; 45 secondes à 68°C; 1 minute à 72°C. Dans les puits identifiés 1°, 25 µL du premier PCR ont été chargés sur le gel d'agarose 1% tandis que pour les puits identifiés 2°, 5 µL du second PCR a été chargé.

avec l'amorce antisens bLIF/Exp.1 tandis que l'amplification par PCR a été effectuée avec les amorces bLIF/Exp.A et bLIF/Exp.1. L'amplification a généré un fragment d'environ 630 pb, tandis que l'amplification (à partir du premier PCR Exp.A/Exp.1) avec les amorces bLIF/Exp.A et bLIF.6(bt) a généré un fragment de grandeur approximative de 560 pb. La figure 9 montre que la plupart des tissus expriment le gène LIF. Il existe toutefois quelques exceptions dont l'estomac et le tissu utérin. Par contre, le tissu utérin utilisé n'a pas exprimé LIF même si les cellules endométriales primaires et immortalisées isolées à partir de corne utérine l'exprime.

3.5 ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GÈNE LIF BOVIN DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES PRIMAIRES (NON TRANSFORMÉES)

3.5.1 Analyse de l'expression par RT-PCR

Des cellules épithéliales ou stromales non-transformées ont été exposées à différents stéroïdes et l'ARN en a été isolé. Chaque type cellulaire a été étudié à deux reprises, cela signifie que deux expériences indépendantes ont été effectuées. La figure 10 montre les résultats de l'amplification avec les amorces Exp.A et Exp.1 de l'ADNc provenant de cet ARN. La figure 10 démontre qu'en présence de progestérone, l'expression de LIF est augmentée. Un contrôle a été fait en utilisant le gène GAPDH (figure 11). Pour ce contrôle, la provenance de l'ARN est la même que celle utilisée pour l'amplification de LIF mais les amorces ont été spécifiques pour le gène GAPDH. Pour ce qui est du protocole de RT-PCR les mêmes quantités que celles utilisées pour le gène LIF ont été respectées.

Il est à noter que l'expérience de culture avec les stéroïdes a été répétée plusieurs fois, c'est-à-dire, qu'à plusieurs reprises des cellules endométriales primaires (épithéliales ou stromales) ont été isolées et mises en culture en présence de stéroïdes pour en extraire l'ARN. Cet ARN a par la suite été vérifié pour l'expression de LIF. L'augmentation de l'expression n'était pas toujours aussi évidente en présence de progestérone pour tous les essais.

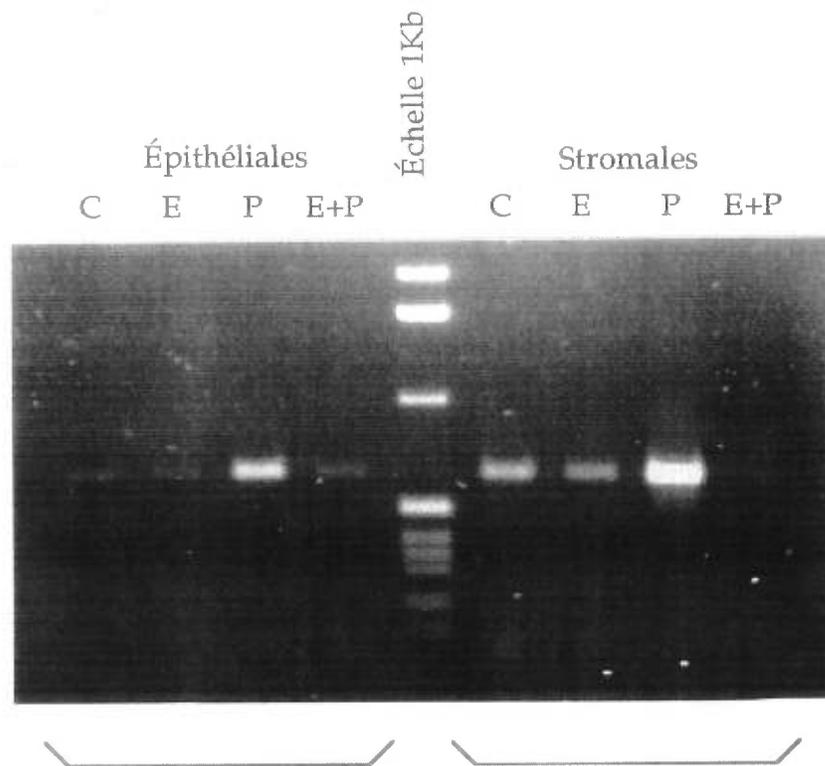


Figure 10: **Étude de la modulation de l'expression de LIF bovin par les stéroïdes.** La réaction de RT-PCR a été exécutée sur de l'ARN isolé à partir de cellules endométriales primaires épithéliales et stromales de cornes utérines bovines. Ces cellules sont mises en culture pour 10 jours sous l'influence de différents traitements hormonaux. Les conditions de RT-PCR étaient similaires à celles de la figure 5 à l'exception que 25 cycles de PCR ont été exécuté pour les cellules épithéliales tandis que pour les cellules stromales 30 cycles ont été complétés. 25 μ l de chaque PCR a été changé sur un gel d'agarose de 1%.

C:RPMI sans stéroïde (milieu contrôle), E:RPMI avec œstrogène (100 pg/ml), P:RPMI avec progestérone (10 ng/ml), E+P:RPMI avec œstrogène (10 pg/ml) et progestérone (10 ng/ml).

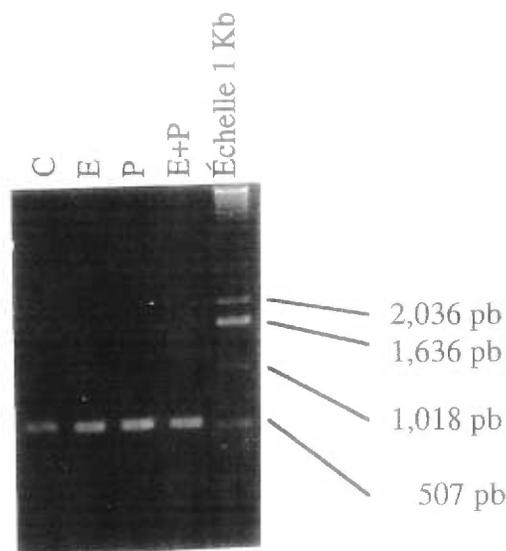


Figure 11: **Étude de la modulation de l'expression de GAPDH par les stéroïdes.** Cette étude sert de contrôle pour l'étude de modulation de l'expression du gène LIF. Les résultats de l'amplification du gène GAPDH ont été obtenus à partir du même ARN que celui utilisé pour les études d'expression du gène LIF, de plus, les mêmes conditions ont été utilisées pour l'amplification par PCR à l'exception des amorces et du nombre de cycles d'amplification. Ainsi, les amorces utilisées sont spécifiques au gène GAPDH, soit les amorces GAPDH.A et GAPDH.1. Le nombre de cycles effectués pour l'amplification du gène GAPDH fut de 20 cycles. La bande visualisée grâce au bromure d'éthidium se situe plus bas que la bande apparaissant pour l'amplification du gène LIF.

C:RPMI sans stéroïde (milieu contrôle), E:RPMI avec estrogène (100 pg/ml), P:RPMI avec progestérone (10 ng/ml), E+P:RPMI avec estrogène (10 pg/ml) et progestérone (10 ng/ml).

3.5.2 Profil de l'expression de LIF selon la concentration de progestérone utilisés

Les cellules endométriales immortalisées (lignées Endo 8,3) ont été mises en culture en présence de différentes concentrations de progestérone à deux reprises. Les résultats de l'expression n'ont pas permis de déterminer avec certitude la corrélation entre la dose de progestérone et le taux d'expression pour toutes les lignées cellulaires étudiées. En effet, les résultats n'étaient pas assez clairs pour pouvoir en tirer des conclusions, mais une certaine tendance peut s'observer pour la lignée Endo 8,3. La concentration maximum pouvant permettre un maximum d'expression se situe à 10 ng de progestérone par mL de milieu (figure 12).

3.6 ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GÈNE LIF BOVIN DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES IMMORTALISÉES

Le même type d'expérience que celle décrite à la section 3.5 a été exécuté avec les cellules endométriales immortalisées pour les trois lignées cellulaires. Chaque lignée a été étudié au moins une fois. Toutefois, les lignées Endo 7,1 et 8,3 ont été étudiées deux fois. L'utilisation des lignées Endo 8,2 et 8,3 pour le niveau d'expression ne donne pas de résultats aussi clairs pour l'ensemble des lignées, si on compare aux résultats obtenus pour les cellules endométriales primaires. Toutefois, les résultats pour la lignée Endo 7,1 demeurent relativement similaires à ceux obtenus pour les cellules primaires.

3.7 ANALYSE DES ÉLÉMENTS DE RÉPONSE

Une analyse de la séquence d'ADNc incluant le bout 3' a été exécuté pour permettre de déterminer la présence d'éléments de réponse aux hormones (HRE) stéroïdiennes. Le tableau 4 représente la localisation des sites potentiels pour les ERE sur la séquence choisie. La séquence AGGTCA (Ribiero et *al.*, 1995; Glass, 1994) ou AGTTCA (Glass, 1994) représente le demi site palindromique en 5' pour ERE tandis que TGACCT représente le demi site palindromique en 3'.

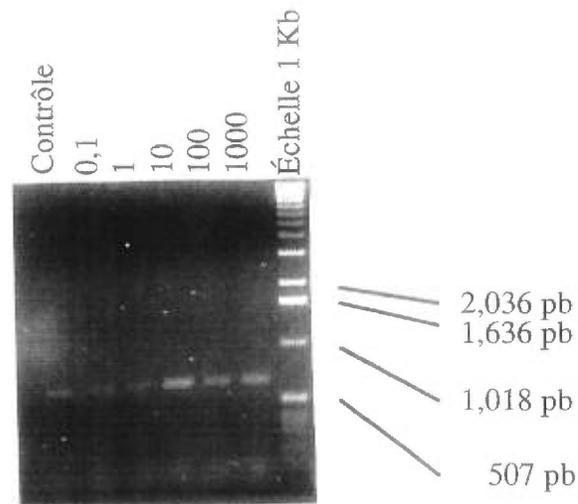


Figure 12: **Étude de la modulation de l'expression de LIF bovin avec différentes concentrations de progestérone.** Pour cette amplification, différentes concentrations de progestérone ont été utilisées variant entre 0 ng de P_4 /mL de milieu de culture et 1000 ng de P_4 /mL de milieu de culture. Les amorces utilisées sont LIF Exp.A et LIF Exp.1. Ces résultats représentent 30 cycles d'amplification et les bandes sont séparées sur un gel d'agarose de 1%.

Séquence 5'	Localisation (en pb)	Séquence 3'	Localisation (en pb)
AGGTCA	578, 1449, 1494, 1 571	TGACCT	497, 1011
AGTTCA	1155	TGACCA	930, 988
AGGTCT	-38, 5, 615, 1119	GGACCT	1347
CGGTCA	86		
AGGTCC	371		

Tableau 4: **Tableau représentant l'emplacement des sites potentiels de réponse à l'oestrogène (ERE).** Les acides nucléiques en gras sont des bases dégénérées.

De plus, un site dégénéré de réponse à la progestérone (PRE), ayant la séquence suivante: AGAACGnnnnnTGTGGT, a été déterminé à la base 1253. Les bases identifiées en gras sont des bases dégénérées. Habituellement, la séquence acceptée pour PRE est la suivante: AGAACAnnTGTCT. La localisation des sites potentiels HRE se retrouve à la figure 13.

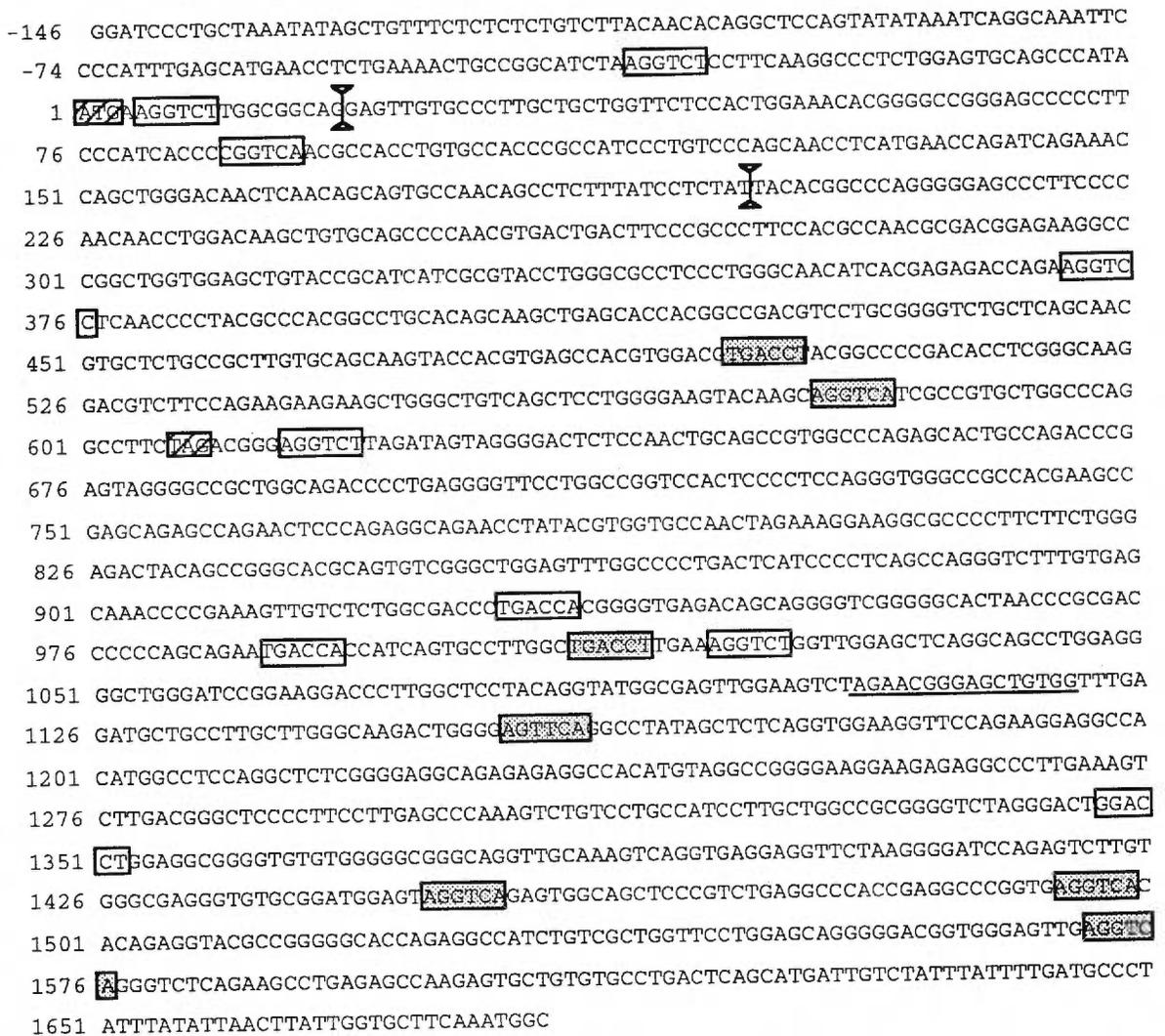


Figure 13 : Étude des sites potentiels pour les éléments de réponse à l'oestrogène et à la progestérone. La séquence d'ADNc a été obtenue et analysée par ordinateur. Les sites potentiels pour ERE et pour PRE ont été retrouvés en majorité dans la partie 3' codante et la partie 3' non-codante, mais également dans la partie 5' codante de l'ADNc. Quelques sites potentiels sont dégénérés et d'autres sont tels que l'indique la séquence publiée du site E₂. Par contre, le site potentiel pour P₄ est plutôt dégénéré.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 L'ANALYSE DE L'ADN GÉNOMIQUE

Suite à la digestion de l'ADN génomique bovine avec l'enzyme de restriction BamHI suivit d'une analyse de type Southern avec le fragment bLIF E/5, nous avons obtenu un fragment d'ADN ayant hybridé à environ 4,2 Kb (Figure 2). Notre étude a été basée sur les études de Willson et *al.* (1992) qui ont démontré un fragment d'environ 5-5,5 Kb chez le bovin par analyse Southern de l'ADN génomique digéré par BamHI. De plus, une digestion de l'ADN génomique murin et humain par l'enzyme de restriction BamHI génère une bande distinctive d'environ 4 Kb par analyse Southern (Gearing et *al.*, 1987; Gough et *al.*, 1988; Stahl et *al.*, 1990). Une séquence nucléotidique obtenue par une équipe japonaise a aussi démontré la présence de sites BamHI à chaque extrémité d'un fragment d'ADN de 3,68 Kb (Genbank D50337). Ces différences semblent énormes, mais il faut considérer que les grandeurs établies ne sont que des estimations puisque les résultats de Southern sont difficiles à lire. La différence entre les fragments obtenues par les différentes expériences peuvent s'expliquer par le manque de précision lors de la détermination de la distance de migration des bandes observées. De plus, la migration des fragment est plus ou moins uniforme tout au long de l'électrophorèse. Ainsi, les bandes observé sur le gel d'électrophorèse ne sont pas toujours parfaitement perpendiculaire aux sites de départ, se qui amplifie les problèmes de détermination de la distance de migration. Une différence génétique dans les populations analysées peut également expliquer ces grandeurs variables des fragments obtenues à la suite de la digestion par BamHI.

Le séquençage du fragment de 4,2 Kb, à l'aide de plus petits fragments obtenus par PCR, nous a permis de déterminer une partie de la séquence génomique du gène LIF bovin (résultats non rapportés). L'amplification de la partie 5' du gène codant pour LIF à partir du site de restriction BamHI fut difficile par la méthode de clonage utilisant le fragment de 4,2 Kb inclus dans un plasmide. Nous avons donc contourné le problème en utilisant le fragment de 4,2 Kb ligué sur lui-même et des amorces spécifiques pour le gène LIF bovin (PCR inversé). Les amorces utilisées furent LIF.L du bout 3' comme amorce sens et LIF.11B du bout 5' comme amorce antisens. De cette façon, le fragment amplifié

possédera, dans l'ordre, les sites suivants: LIF.L, BamHI et LIF.11B. Le bout 5' recherché se situe entre le site BamHI et l'amorce LIF.11B. Les autres fragments amplifiés dont E/5, H/T3 et Exp.A/7 l'ont été par clonage et par PCR traditionnelle. Par contre, le fragment compris entre les amorces bLIF Exp.A et bLIF.7 n'a pas été séquencé puisque l'équipe de Kudo et *al.* (GenBank D50337) en a déterminé et déposé la séquence génomique de LIF bovin dans le domaine public (GenBank D50337). Toutefois nous ne connaissons pas leur méthode de clonage. Une autre équipe a déterminé la séquence génomique en y ajoutant cette fois, une portion en 5' du site BamHI augmentant ainsi la séquence de 1130 pb en 5' (Piedrahita et *al.* 1997). En comparant la séquence de Kudo et *al.* à notre séquence, il existe quelques différences ponctuelles. De plus, notre séquence comparée avec celle de Piedrahita et *al.* (1997) comporte également quelques différences ponctuelles. Par contre, ces différences diminuent lorsque l'on compare les trois séquences entre elles. Il n'y a que deux bases qui ne correspondent ni à l'une ni à l'autre des séquences. Ainsi, la séquence déterminée par nos recherches, arbore une grande homologie avec différentes espèces (voir tableau 3) et avec les séquences bovines déjà publiées. Les différences dans les séquences peuvent être causées par des erreurs lors du clonage, lors du séquençage, lors de l'amplification par PCR ou par une variance dans la population causée par des différences dans les allèles.

4.2 L'ANALYSE DE L'ADNc

Après avoir déterminé la séquence génomique partielle de LIF bovin, nous avons donc poursuivi les études vers d'autres directions, soit dans la détermination de la séquence de l'ADNc de LIF, dans la portion 3' non-traduite (3' UTR). Ce travail a été réalisé par l'utilisation de la RT-PCR à partir d'ARN total isolé de cellules primaires endométriales ou des cellules de poumon.

4.2.1 L'analyse de l'extrémité 3' non codante

Au meilleur de notre connaissance, le transcrit pour le gène bLIF n'a jamais été isolé ni séquencé auparavant. L'ARN poly A a donc été isolé de tissus sélectionnés soit de poumon ou de lignées de cellules endométriales 8,3 et converti en ADNc. Ceci nous

a permis de déterminer, à l'extrémité 3', 621 pb de plus que les séquences déjà disponibles, représentant un total de 1082 pb du codon "stop" à la queue poly A.

4.2.2 Comparaison entre l'ADN et ARN

L'analyse de la séquence de 609 bp par ordinateur, nous a permis de déterminer le codon d'initiation de la traduction du gène LIF ainsi que le site de terminaison, le cadre de lecture ouvert du gène LIF, le bout 3' UTR (la portion 5' UTR n'a pas été analysé). De plus, en comparant l'ADN génomique et l'ADNc, il est possible de déterminer la limite des introns/exons (identifiée à la figure 5). Le premier intron se situe après la base 19 de l'ADNc alors que le second se situe après la base 198. Ces limites introns/exons correspondent aux limites introns/exons déterminées chez l'humain et la souris.

La région 3' UTR contient deux signaux potentiels de poly-adénylation (voir la figure 5), le signal classique est identifié par une séquence riche en AU sur l'ARNm (riche en TA sur ADNc ou ADN génomique). Le signal possède généralement la séquence suivante: AAUAAA (environ 10 à 30 bases en aval de la queue poly A; Darnell et *al.*, 1993).

4.2.3 L'analyse de la séquence protéique

L'analyse de la séquence par ordinateur, nous a indiqué le site d'initiation de la traduction identifiée par la première méthionine (Met). Nous avons comparé notre séquence protéique bovine à celle des autres espèces dont l'humain, le porc, le mouton et la souris. Nous pouvons constater un grande identité parmi les espèces, toutefois, certains acides aminés ne correspondent pas. Pour les 204 acides aminées de la protéine, seulement deux demeurent complètement différents de la séquence des autres espèces comparées. Nous concluons que LIF est une protéine qui a été fortement conservée au cours de l'évolution.

4.3 L'ÉTUDE D'EXPRESSION DE LIF DANS DIFFÉRENTS TISSUS BOVINS

Nous avons isolé l'ARN total provenant de différents tissus bovins. Une analyse par RT-PCR nous a permis de déterminer quelques tissus avec une concentration élevée de l'ARN codant pour LIF. Ce même type d'études a été effectué, chez la souris, par l'équipe de Robertson et *al.* (1993). Les résultats obtenus par cette équipe corroborent avec nos résultats. Toutefois, leurs études ont été basées sur la méthode de protection par la ribonucléase (RPA) qui demeure moins sensible que la méthode par PCR.

L'analyse par RT-PCR présente à la figure 9 démontre que le premier PCR génère un bande visible d'environ 633 pb, tandis que le second PCR ("nested") a généré une bande d'environ 557 pb. Il est à noter que le gel d'agarose a été chargé avec 25 μ L du premier PCR et de 5 μ L du second, dû à l'amplification du signal par PCR. Comme le démontre la figure 9, plusieurs tissus expriment LIF bovin. Les résultats de nos amplifications démontrent que l'expression bovine se retrouve dans la plupart des mêmes tissus que chez la souris (Robertson et *al.*, 1993). Ces résultats corroborent avec les différents rôles qui sont attribués à cette molécule de type cytokine et que les rôles peuvent varier selon les cellules cibles (voir section 1.2 de l'introduction).

Même si l'utérus utilisé est composé de cellules endométriales, il ne démontre pas d'expression de LIF. Toutefois, une expression se voit dans les cellules épithéliales primaires et des cellules endométriales immortalisées. Il a effectivement été démontré par différents chercheurs que LIF est exprimé dans l'utérus de plusieurs espèces. Par contre, certains chercheurs ont aussi déterminé que cette expression se limite à des temps précis chez certaines espèces (voir section 1.4 de l'introduction). Ainsi, l'utérus utilisé pour extraire l'ARN pourrait avoir été récupéré au moment où l'expression de LIF n'avait pas lieu. Les cellules utilisées pour cette expériences sont âgées entre 7 à 10 après l'ovulation ce qui correspond environ au stade où l'embryon est au stade de blastocyste. Ce stade est reconnu par certains chercheurs comme étant le stade où l'embryon humain (Sharkey et *al.*, 1995; Nachtigall et *al.*, 1996) et l'embryon murin (Stewart et *al.*, 1995) possèdent des récepteurs pour LIF et où l'embryon est prêt à répondre à la présence de LIF.

Une autre possibilité pour l'absence de signal serait que la partie utilisé pour l'extraction d'ARN pouvait ne pas contenir assez de cellules endométriales pour voir un signal après le PCR. Il faut demeurer prudent en comparant l'expression dans les tissus avec celle des cellules, puisque les tissus sont un ensembles de cellules qui peuvent

s'influencer entre elles. De plus, d'autres molécules peuvent être emmagasinées dans les tissus sans y être produit ce qui peut provoquer une fausse représentation de l'expression.

4.4 LA CONSTRUCTION DE LIGNÉES CELLULAIRES

La construction des lignées cellulaires immortalisées a nécessité un plasmide contenant le grand gène TAg (Large TAg) originalement du virus SV40. La méthode de transformation utilisée pour immortaliser les cellules endométriales bovines est une méthode utilisée de routine. Le plasmide auquel nous avons incorporé le gène TAg contenait également un gène pour la résistance à la néomycine (Néo). Toutefois, nous avons utilisé le produit G-418 pour la sélection des cellules possédant à la fois le gène Néo et le gène TAg, puisque la généticine et la néomycine sont des produits compatibles. Nous avons réussi à obtenir 3 lignées de cellules endométriales transformées. Toutefois, l'analyse morphologiques de ces cellules, l'étude de co-culture avec des embryons bovin et l'analyse de l'expression pour des gènes endométriales spécifiques restent à faire.

Il existe effectivement d'autres lignées cellulaires endométriales immortalisées, entre autre, une lignée de cellules endométriales de type fibroblastes chez l'humain (Brosens et *al.*, 1996), des lignées de cellules endométriales de type épithéliales et de type stromales chez le vison (Moreau et *al.*, 1995), des lignées de cellules endométriales de type épithéliales chez le porc (Li et *al.*, 1992) et des lignées de cellules endométriales chez le lapin (Chen et *al.*, 1991). Toutefois, aucune lignée cellulaire endométriale épithéliale ou stromale bovine n'a été mentionnée jusqu'à présent.

4.5 L'INFLUENCE DES HORMONES STÉROÏDIENNES

4.5.1 L'influence de différentes hormones sur les cellules primaires

Pour démontrer une influence de la part des hormones stéroïdiennes, nous avons mis les cellules primaires de types épithéliales, de types stromales et les cellules endométriales transformées en présence soit, d'aucune hormone, d'oestrogène seulement, de progestérone seulement ou d'oestrogène et de progestérone. La culture en présence de

ces hormones a été réalisée pendant 10 jours après avoir atteint la confluence des cellules. Après quoi, l'isolation de l'ARN a été exécutée.

Une fois les préliminaires mis en place, un RT-PCR a été effectué sur cet ARN. L'ARN a été quantifié et une même concentration de départ a été utilisée pour chaque réaction de transcription inverse. Pour exécuter la PCR, la même stratégie fut appliquée, ainsi une même quantité provenant de la RT a été utilisée pour faire l'amplification par PCR. Le matériel de départ fut le même pour chaque réaction de RT-PCR. Il est à noter, que de par sa nature, l'amplification par RT-PCR demeure une analyse qualitative et non une analyse quantitative au sens propre. Ainsi, il faut demeurer prudent dans l'analyse des résultats.

De plus, pour valider l'effet des stéroïdes sur LIF, les mêmes étapes ont été effectuées avec le même matériel et les mêmes quantités d'ARN de départ pour l'amplification d'un gène contrôle soit le gène "glycéraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase" (GAPDH). Les résultats d'amplifications du gène GAPDH utilisant de l'ARN isolées de cellules traitées avec différents stéroïdes ont montré un signal constant indépendamment du type ou de la dose de stéroïdes utilisé (Figure 11). Toutefois, pour augmenter la crédibilité du test, le nombre de cycle pour la réaction de PCR aurait du être diminué pour éviter d'atteindre une amplification maximale. La variation du signal pour LIF en fonction du traitement aux hormones stéroïdiennes provient réellement d'une présence accrue du transcrit de LIF dans l'ARN de départ.

Si on examine les résultats obtenus à partir des cellules épithéliales, on remarque un signal plus élevé pour les cellules ayant été exposées à la progestérone seulement. Nos résultats corroborent ceux de Vogiagis et *al.* (1997) pour les cellules épithéliales glandulaires issus de brebis ovariectomisées. Ainsi, une fois les animaux ovariectomisées, les hormones provenant du cycle oestral normal sont absentes de la circulation et le contrôle de l'expression de LIF est occasionnée par les stimuli hormonaux externes (injectés). Ainsi, le fonctionnement des deux type cellulaires utilisés pour les études de Vogiagis et *al.* (1997) et nos études se ressemble en ce qui concerne l'expression de LIF. Le système *in vivo* utilisé par Vogiagis et *al.* (1997) se compare à notre système *in vitro*. De plus, dans les deux cas les stimuli hormonaux proviennent d'une source externe.

D'autres études du contrôle de l'expression de la protéine dans l'utérus (souris) ou sécrétée dans le milieu de culture (humain) ont été exécutées. Ces études montrent que E₂ stimule l'expression de LIF entre autre chez la souris (Yang *et al.*, 1996) et l'humain (Laird *et al.*, 1997). Nous avons obtenu des résultats contraire chez le bovin. L'oestrogène semble produire l'effet d'inhibition de l'expression de LIF, puisque le signal du PCR fut diminué par rapport au contrôle autant dans les cellules stromales que les cellules épithéliales. De plus, l'effet bénéfique de la progestérone est aussi inhibé lorsque les cellules ont été incubées en présence d'oestrogène et de progestérone en même temps. Ainsi, l'oestrogène inhibe l'effet positif produit par la progestérone. La différence reliée aux hormones qui influencent positivement ou négativement la production de LIF peut être attribuable aux différences dans le système reproducteur des espèces analysées.

L'amplification de l'ARN provenant des différents traitements hormonaux a produit relativement les mêmes résultats pour les cellules stromales que pour les cellules épithéliales. Toutefois, LIF demeure moins fortement exprimé dans les cellules stromales, puisque le nombre de cycles de PCR doit être augmenté pour obtenir un signal équivalent au signal obtenu pour les cellules épithéliales. Contrairement à ce que nous avons observé pour les cellules stromales bovines, l'équipe de Stewart *et al.* (1995) n'a observé aucune stimulation hormonale de la production de LIF pour les cellules stromales murines. Lavranos *et al.* (1995) ont évalué que les hormones stéroïdiennes n'influençaient pas l'expression de LIF dans les cellules endométriales épithéliales et stromales de souris en monocouche. Par contre, les études de Sawai *et al.* (1997) chez l'humain ont démontré un effet sur l'expression de LIF avec les cellules d'origines stromales (déciduelles) stimulées aux hormones stéroïdiennes. Toutefois, ces cellules déciduelles différenciées n'ont peut être pas exactement le même mécanisme que les cellules stromales non différenciées.

Étant donné un signal plus faible pour l'expression LIF dans les cellules stromales, la possibilité existe que ces dernières puissent être contaminées avec les cellules épithéliales. En effet, lors de l'isolation des deux types cellulaires, une première digestion de la corne utérine est effectuée suivi d'une centrifugation pour permettre la séparation des cellules épithéliales. Une seconde digestion de la corne suivi également d'une centrifugation permet de séparer les cellules stromales. La possibilité que des cellules épithéliales soient demeurées fixées à la corne lors de la première digestion et séparées de la corne lors de la deuxième digestion n'est pas exclue. Toutefois, si cette hypothèse est retenue, la population des deux types cellulaires sera augmentée de façon proportionnelle à la quantité de départ mis en culture.

4.5.2 L'influence de différentes hormones sur les lignées cellulaires

Lors de l'étude avec les lignées de cellules endométriales immortalisées, les résultats n'ont pas été aussi concluants. En fait, l'étude a été exécutée sur plusieurs lignées différentes. Pour certaines lignées, les résultats étaient reproductibles alors qu'ils ne l'étaient pas pour d'autres lignées. Chaque lignées peut donc avoir une différence au niveau de l'expression de la protéine LIF. De plus, il faut noter que, nous avons attendu que les cellules aient atteint la confluence avant de réaliser l'extraction de l'ARN. En effet, les études de Rathjen et *al.* (1990a) et celles de Smith et Rathjen (1991) ont démontré que LIF était exprimé dans les cellules en phase de prolifération. Est-ce que l'atteinte de la confluence par ces cellules modifie l'expression de certains gènes?

4.5.3 L'influence de différentes concentrations de progestérone sur les lignées cellulaires

Une autre étude a été réalisée sur une des lignées de cellules endométriales. Cette étude consistait à exposer les cellules à des concentrations croissantes de progestérone. Le même temps de culture a été respecté pour cette expérience que pour l'expérience précédente.

Cette expérience a démontré une tendance, c'est-à-dire qu'à une concentration de 10 ng de progestérone/ml de milieu de culture l'expression de LIF est à son maximum. L'expression de LIF diminue peu importe si la concentration de progestérone dans le milieu de culture diminue ou si elle augmente. Il demeure toutefois difficile de tirer des conclusions nettes, puisque toutes les lignées n'ont pas réagi de façon similaires. De plus, le contrôle sans progestérone a exprimé aussi fortement le gène LIF que pour la concentration de 0,1 ng de progestérone/mL de milieu (figure 12). Une saturation due au nombre de cycles élevés de PCR (35 cycles) pourrait expliquer nos résultats, puisqu'à 30 cycles le contrôle (sans hormone) semble aussi faible que pour la concentration de 0,1 ng/ml. Est-ce que ce phénomène pourrait se produire également dans la nature? Ainsi, lorsque le niveau de progestérone est trop élevé, elle produirait une autre réaction et/ou une autre protéine qui irait à son tour agir sur l'expression de LIF.

Enfin, le manque de précision de nos résultats peut également être attribuable à la longue durée d'exposition des cellules aux hormones ou encore à la variabilité des différentes lignées cellulaires employées.

4.5.4. L'analyse de séquences du gène LIF bovin pour des éléments de réponse aux hormones (HRE)

L'analyse de la séquence d'ADN génomique déterminée par Piedrahita et *al.* (1997) n'a pas permis d'identifier d'éléments de réponse à l'oestrogène (ERE) ou d'éléments de réponse à la progestérone (PRE) (Ribeiro et *al.*, 1995; Glass 1994) dans la partie 5' ni dans les introns. Toutefois, cela ne veut pas dire que les éléments de réponse ne se retrouvent pas en amont. En effet, l'équipe de Kato et *al.* (1992) a déterminé que les éléments de réponse pouvaient être situés aussi loin que 3,3 Kb en amont du gène cible.

L'analyse de notre séquence a permis de déterminer des sites potentiels ERE complets ou dégénérés vers le bout 3' du transcrit ainsi que dans la partie non codante de l'ARNm que nous avons déterminée. Un site potentiel pour PRE a également été trouvé mais il est plutôt dégénéré (Figure 13). Il demeure toujours possible que d'autres sites PRE et/ou ERE se trouvent plus loin en 5' ou en 3' de la séquence déjà déterminée par les études de Piedrahita et *al.* (1997) et par nos études. De plus, il est possible que la progestérone agisse indirectement sur le gène LIF bovin. Ainsi, lors de la présence de progestérone, cette dernière agirait sur une tierce molécule qui à son tour agirait sur le contrôle de l'expression du gène LIF bovin, à proximité du gène LIF ou sur son propre élément de réponse. Ces sites potentiels pourraient expliquer l'influence qu'exerce les hormones sur l'expression de LIF.

CONCLUSION

Étant donné la grande homologie avec les séquences connues, nous avons donc accepté que la séquence partielle déterminée, à partir de la bande de 4,2 Kb purifiée d'une digestion de l'ADN génomique avec BamHI, était bel et bien la séquence de LIF bovin. Nous avons isolé le transcrit du gène LIF bovin du site d'initiation ATG jusqu'au poly A en bout 3' en utilisant une stratégie de clonage par PCR. De plus, la séquence de l'ADNc a été déterminée et les limites introns/exons ont été vérifiées. Le transcrit du gène LIF n'avait pas été isolé et l'ADNc n'avait pas été séquencé auparavant. Nous avons réussi à déterminer la séquence voulue en plus de déterminer la séquence de l'extrémité 3' non codante (3' UTR). La séquence 3' UTR déterminée fut de 621 paires de bases excédant les séquences disponibles jusqu'à présent ce qui donne un fragment de 1082 pb du codon "stop" à la queue poly A. Au point de vue cellulaire, nous avons réussi à créer, pour la première fois, des lignées endométriales bovines. Nous avons également déterminé que les cellules épithéliales et stromales, de même que quelques lignées de cellules endométriales pouvaient exprimer LIF. De plus, ces dernières augmentent leur expression de LIF en présence de progestérone. Cet effet positif de la progestérone fut inhibé par la présence d'oestrogène. Donc, *in vivo*, l'expression de LIF pourrait être induit par les fluctuations hormonales du système reproducteur, toutefois, ceci demeure à démontrer. Nous avons également identifié plusieurs sites potentiels ERE dans le bout 3', autant dans le cadre de lecture ouvert que dans la partie non traduite, qui pourrait permettre d'expliquer l'effet de l'oestrogène sur l'expression de LIF par les cellules endométriales en culture.

Les prochaines étapes à suivre, pour approfondir le projet seraient de déterminer la pureté des lignées cellulaires par une simple étude d'immuno-histochimie identifiant les marqueurs cellulaires (tels la vimentine pour les cellules stromales, la cytokératine pour les cellules épithéliales et la fibronectine pour les fibroblastes). De plus, une étude *in vivo* pourrait être effectuée pour déterminer l'expression de LIF au cours du cycle reproducteur de la vache. Ceci permettra de vérifier si le même patron d'expression s'observe *in vivo* par rapport aux influences stéroïdiennes observées *in vitro*. Un autre aspect intéressant serait de vérifier le développement des embryons bovins en présence des lignées cellulaires endométriales ou de LIF recombiné *in vitro* et ainsi, déterminer si les lignées cellulaires endométriales et/ou LIF recombiné provoquent une influence positive ou négative sur le développement embryonnaire.

BIBLIOGRAPHIE

Abe E., Tanaka H., Ishimi Y., Miyaura C., Hayashi T., Nagasawa H., Tomida M., Yamaguchi Y., Hozumi M. et Suda T. (1986). Differentiation-inducing factor purified from conditioned medium of mitogenic-treated spleen cells culture stimulates bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83:**5958-5962.

Ace C.I. et Okulicz W.C. (1995) Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.* **115:**95-103.

Anegon I., Cuturi M.C., Godard A., Moreau M., Terqui M., Martinat-Botté F. et Soullillou J.P. (1994) Presence of leukemia inhibitory factor and interleukine 6 in porcine uterine secretions prior to conceptus attachment. *Cytokine.* **6(5):**493-499.

Arici A., Engin O., Attar E. et Olive D.L. (1995) Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80(6):**1908-1915.

Bhatt H., Brunet L.J. et Stewart C.L. (1991) Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88:**11408-11412.

Brosens J.J., Takeda S., Acevedo C.H., Lewis M.P., Kirby P.L., Symes E.K., Krausz T., Purohit A., Gellersen B. et White J.O. (1996) Human endometrial fibroblasts immotilized by semian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stimulus. *Endocrinology.* **137:**2225-2231.

Chaouat G., Menu E., Delage G., Moreau J.-F., Khrishnan L., Hui L., Meliani A.A., Martal J., Raghupathy R., Lelaidier C., Bertrand C., Freitas S., Hambartsumian E., Wegmann T.G. et Frydman R. (1995) Immuno-endocrine interactions in early pregnancy. *Hum. Reprod.* **10 (suppl.2):**55-59.

Charnock-Jones D.S., Sharkey A.M., Fenwick P. et Smith S.K. (1994) Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J. Reprod. Fertil.* **101**:421-426.

Chen C.L., Simmen R.C. et Chou J.Y. (1991) Characterization of endocrine cell lines immortalized by temperature-sensitive mutant SV40. *Chinese Journal of physiology.* **34**:65-80.

Chen D-B., Hilsenrath R., Yang Z.-M., Le S.-P., Kim S.-R., Chuong C.J., PiondexterIII A.N. et Harper M.J.K. (1995) Leukaemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: Cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin *in vitro*. *Hum. Reprod.* **10**(4):911-918.

Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**:5294-5299.

Chomczynski P. et Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroforme extraction. *Analytical Biochemistry* **162**:156-159.

Conquet F. et Brulet P. (1990) Developmental expression of myeloid leukemia inhibitory factor gene in preimplantation blastocyst and in extraembryonic tissue of mouse embryos. *Mol. Cell. Biol.* **10**:3801-3805.

Conquet F., Peyri eras N., Tiret L. et Br ulet P. (1992) Inhibited gastrulation in mouse embryos overexpressing the leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8195-8199.

Cullinan E.B., Abbondanzo S.J., Anderson P.S., Pollard J.W., Lessey B.A. et Stewart C.L. (1996) Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:3115-3120.

Darnell, Lodish et Baltimore (1993) Synthèse et maturation de l'ARN chez les eucaryotes. Chapitre 8 dans *Biologie moléculaire de la cellule*. 2^{ième} édition. édité par Camille François. De Boeck Université. De Boeck-Wesmael. Bruxelles. pp.261-316.

Davis S., Aldrich T.H., Stahl N., Pan L., Taga T., Kishimoto T., Ip N.Y. et Yancopoulos G.D. (1993) LIFRb and gp130 as heterodimerizing signal transducer of the tripartite CNTF receptor. *Science*. **260**:1805-1808.

Dunglison G.F., Barlow D.H. et Sargent I.L. (1996) Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum. Reprod.* **11**(1):191-196.

Feldman B., Poueymirou W., Papaioannou V.E., De C.T. et Goldfarb M. (1995) Requirements of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*. **267**:246-249.

Finn C.A. (1982) Cellular changes in the uterus during the establishment of pregnancy in rodents. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **31**:105-111.

Flint A.P. (1995) Interferon, the oxytocine receptor and the maternal recognition of pregnancy in ruminants and non-ruminants: a comparative approach. *Reprod. Fertil. and Dev.* **7**(3):313-318.

Fry R.C., Batt P.A., Purdon T.L., Kerton D.J., Fairclough R.J. et Parr R.A. (1991) Leukaemia inhibitory factor improves the health of cultured ovine embryos. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* **23**(abstr):126.

Fry R.C. (1992) The effect of leukaemia inhibitory factor (LIF) on embryogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* **4**:449-458.

Fry R.C., Batt P.A., Fairclough R.J. et Parr R.A. (1992) Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol. Reprod.* **46**:470-474.

Gearing D.P., Gough N.M., King J.A., Hilton D.J., Nicola N.A., Simpson R.J., Nice E.C., Kelson A. et Metcalf D. (1987) Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). *The EMBO Journal*. **6(13)**:3995-4002.

Gearing D.P., Thut C.J., VandenBos T., Gimpel S.D., Delaney P.B., King J., Price V., Cosman D. et Beckmann P.M. (1991) Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to IL-6 signal transducer, gp130. *The EMBO Journal*. **10(10)**:2839-2848.

Gearing D.P., Comeau M.R., Friend D.J., Gempel S.D., Thut C.J., McGourty J.K., Brahser K., King J.A., Gillis S., Mosley B., Ziegler S.F. et Cosman D. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*. **255**:1434-1437.

Gearing D.P. (1993) The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Adv. Immunol.* **53**:31-58.

Glass C.K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* **15**:391-407

Godard A., Heymann D., Raher S., Anegon I., Peyrat M.A., Le Mauff B., Mouray E., Gregoire M., Virdee K., Soullillou J.P., Moreau J.F. et Jacques Y. (1992) High and low affinity receptors for human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor on human cells. *J. Biol. Chem.* **267**:3214-3222.

Gough N.M., Gearing D.P., King J.A., Willson T.A., Hilton D.J., Nicola N.A. et Metcalf D. (1988) Molecular cloning and expression of the human homolog of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **35**:2623-2627.

Hambartsoumian E. (1997) Human endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) secretion and its relationship to sonographic endometrial appearance. *American J. of Reprod. Immunol.* **37**:320-325.

Harvey M.B., Leco K.J., Arcellana-Panlilio M.Y., Zhang X., Edwards D.R. et Schultz G.A. (1995a) Roles of growth factors during peri-implantation development. *Mol. Hum. Reprod.* **10(3)**:712-718.

Harvey M.B., Leco K.J., Arcellana-Panlilio M.Y., Zhang X., Edwards D.R. et Schultz G.A. (1995b) Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development.* **121(4)**:1005-1014.

Hassan-Hauser C., Schellander K., Korb H., Knaus E. et Mayr B. (1990) Long-term culture of cattle embryos with the aim of establishing totipotent embryo stem cells. *Reprod. Domest. Anim.* **25**:22-32.

Hilton D.J., Nicola N.A., Gough N.M. et Metcalf D. (1988a) Resolution and purification of three distinct factors produced by krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *The Journal of Biological Chemistry.* **263(19)**:9238-9243.

Hilton D.J., Nicola N.A. et Metcalf D. (1988b) Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells. *Analytical Biochemistry.* **173**:359-367.

Hilton D.J. et Gough N.M. (1991) Leukemia inhibitory factor: a biological property. *J. Cell Biochem.* **46**:21-26.

Hilton D.J. (1992) LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem. Sci.* **17**:72-76.

Hilton D.J., Nicola N.A. et Metcalf D. (1992) Distribution and binding properties of receptors for leukaemia inhibitory factor. *Ciba Foundation Symposium.* **167**:227-239. Discussion 2369-344.

Huet-Hudson Y.M., Chakraborty C., De S.K., Suzuki Y., Andrews G.K. et Dey S.K. (1990) Estrogene regulates synthesis of EGF in mouse uterine epithelial cells. *Mol. Endocrinol.* **4**:510-523.

Jessel T.M. et Melton D.A. (1992) Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell.* **68**:257-270.

Juriscova A., Ben-Chetrit A., Varmuza S.L. et Casper R.F. (1995) Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertil. Steril.* **64**(5):999-1002.

Kato S., Tora L., Yamauchi J., Masushige S., Bellard et Chambon P. (1992) A far upstream estrogen response element of the ovalbumine gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell.* **68**:731-742.

Kojima K., Kanzaki H., Iwai M., Hatayama H., Fujimoto M., Inoue T., Horie K., Nakayama H., Fijita J. et Mori T. (1994) Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol. Reprod.* **50**:882-887.

Kover K.L., Liang L., Andrews G.K. et Dey S.K. (1995) Differential expression and regulation of cytokine genes in the mouse uterus. *Endocrinol.* **136**:1666-1673.

La Bonnardiere C. (1993) Nature and possible functions of interferons secreted by the preimplantation pig blastocyst. *J. Reprod. Fertil.* **48**:157-170.

Laird S.M. Tuckerman E.M. Dalton C.F. Dunphy B.C., Li T.C. et Zhang X. (1997) The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushing and production by cells in culture. *Human Reprod.* **12**(3):569-574.

Lavranos T.C. et Seamark R.F. (1989) Addition of steroids to embryo-uterin monolayer co-culture enhances embryo survival and implantation *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development.* **1**:41-46.

Lavranos T.C., Rathjen P.D. et Seamark R.F. (1995) Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* **105**:331-338.

Lawton J., Cross B.A., Metcalf D., Ward L.D., Simpson R.J. et Nicola N.A. (1992) A major binding protein for leukemia inhibitory factor in normal mouse serum: Identification as a soluble form of the cellular receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8616-8620.

- Leary A.G., Wong G.G., Clark S.C., Smith A.G. et Ogawa M.** (1990) Leukemia inhibitory factor differentiation-inhibiting activity/human interleukine for DA cells arguments proliferation of human hematopoietic stem cells. *Blood*. **75**:1960-1964.
- Li W.I., Wu H., Chin M.P. et Wu G.** (1992) Porcine endometrial epithelial cells immortalized by transfection with origin-defective, temperature-sensitive simian virus 40 DNA. *Life Science* **51**:1969-1979.
- Lotem J. et Sachs L.** (1980) Potential pre-screening for therapeutic agents that induce differentiation in human myeloid leukemia cells. *Int. J. Cancer*. **25**:561-564.
- Lotem J. et Sachs L.** (1984) Control of *in vivo* differentiation of myeloid leukemia cells. IV. Inhibition of leukemia development by myeloid differentiation-inducing protein. *Int. J. Cancer*. **33**:147-154.
- Mc Master M.T., Newton R.C., Dey S.K. et Andrews G.K.** (1992) Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J. Immunol.* **148**:1699-1705.
- Mathialagan N. et Roberts R.M.** (1994) A role for cytokines in early pregnancy. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. **38**(3):153-162.
- Mereau A., Grey L., Piquet-Pellorce C. et Heath J.K.** (1993) Characterization of a binding protein for leukemia inhibitory factor localized in extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* **122**:713-719.
- Metcalf D. et Gearing D.P.** (1989) Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **86**:5948-5952.
- Metcalf D. et Hilton D.J.** (1991) LIF can potentiate murine megacaryocyte production *in vitro*. *Blood*. **77**:2150-2153.
- Moreau J.-F., Donaldson D.D., Bennett F., Witek-Giannotti J., Clark S.C. et Wong G.G.** (1988) Leukemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukine for DA cells. *Nature*. **336**:690-692.

Moreau G., Arlan A., Douglas D.A., Song J., Smith L.C. et Murphy B.D. (1995) Development of immortalized endometrial epithelial and stromal cell lines from the mink (*Mustela vison*) uterus and their effects on the survival in vitro of the mink blastocysts in obligate diapause. *Biol. Reprod.* **53**:511-518.

Morgan G., Wooding F.B. et Godkin J.D. (1993) Localization of bovine trophoblast protein-1 in the cow blastocyste during implantation: an immunological cryoultrastructural study. *Placenta.* **14**(6):641-649.

Mori M., Yamaguchi K. et Abe K. (1989) Purification of a lipoprotein lipase-inhibiting protein produced by a melanoma cell line associated with cancer cachexia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **160**:1085-1092.

Murphy M., Reid K., Hilton D.J. et Bartlett P.F. (1991) Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:3498-3501.

Murray R., Lee F. et Chui C.P. (1990) The genes of leukemia inhibitory factor and interleukine-6 are expressed in mouse blastocyste prior to onset of hemopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* **10**:156-162.

Murray M.K. (1992) The effect of estrogen and progesterone on structural changes in the uterine glandular epithelium of the ovariectomized sheep. *Biol. Reprod.* **47**:408-417.

Murray M.K. et Sower S.A. (1992) Estrogen and progesteron-dependent secretory changes in the uterus of the sheep. *Biol. Reprod.* **47**:917-924.

Nachtigall M.J., Kliman H.J., Feinberg R.F., Olive D.L., Engin O et Arici A. (1996) The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: A potential role in human implantation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**(2):801-806.

Nichols J., Davidson D., Taga T., Yoshida K., Chambers I et Smith A. (1996) Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development.* **57**:123-131.

- Noden D. et De Lahunta A.** (1985) Extraembryonic membranes and placentation: Developmental mechanisms and malformations. Ch. 3 in *The Embryology of Domestic Animals*. Williams et Wilkins. Baltimore. pp.47-69.
- Papaioannou V.E. et Ebert K.M.** (1986) Comparative aspect of embryo manipulation in mammals. In: *Experimental approaches to mammalian embryonic development*. Rossant, J. and Pedersen, R.A. (eds.) New York, Cambridge University Press.
- Pennica D., Shaw K.J., Swanson T.A., Moore M.W., Shelton D.L., Zioncheck K.A., Rosenthal A., Taga T., Paoni N.F. et Wood W.I.** (1995) Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptro/gp130 signaling complex. *J. Biol. Chem.* **270**:10915-10922.
- Piedrahita J.A., Weeks R., Petrescu A., Shrode T.W., Derr J.N. et Womack J.E.** (1997) Genetic characterization of the bovine leukaemia inhibitory factor (LIF) gene: isolation and sequencing, chromosome assignment and microsatellite analysis. *Animal Genetics.* **28**:14-20.
- Polan M.L., Simon C., Frances A., Lee B.Y. et Prichard L.E.** (1995) Role of embryonic factors in human implantation. *Hum. Reprod.* **10**: suppl. **2**:22-29.
- Pollard J.W., Bartocci A., Arceci R., Orlofsky A., Ladner M.B. et Stanley E.R.** (1987) Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development. *Nature.* **330**:484-486.
- Puissant C. et Houdebine L.-M.** (1990). An improvement of single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocynate-phenol-chloroform extraction. *BioTechnique* **8** (2):148-149.
- Rathjen P.D., Nichols J., Toth S., Edwards D.R., Heath J.K. et Smith A.G.** (1990a) Developmentally programmed induction of differentiation inhibiting activity and the control of stem cell populations. *Genes Dev.* **4**:2308-2318.

Rathjen P.D., Toth S., Willis A., Heath J.K. et Smith A.G. (1990b) Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by altered promoter usage. *Cell*. **62**:1105-1114.

Ribiero C.J.R., Kushner P.J., Baxter J.D. (1995) The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu. Rev. Med.* **46**:443-453.

Robertson M., Chambers I., Rathjen P., Nichols J. et Smith A. (1993) Expression of alternative forms of differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) during murine embryogenesis and in neonatal and adult tissues. *Dev. Genet.* **14**:165-173.

Sambrook J, Fritsch E.F. et Maniatis T. (1989) Expression of cloned genes in cultured mammalian cells. chapter 16: In molecular cloning; A laboratory manual. 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. pp.16.1-16.81.

Sawai K., Matsuzaki N., Kameda T., Hashimoto K., Okada T., Shimoya K., Nobunaga T., Taga T., Kishimoto T. et Saji F. (1995) Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: Its possible implication during pregnancy, including implantation period. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80(4)**:1449-1456.

Sawai K., Matsuzaki N., Kameda T., Okada T., Shimoya K., Koyama M., Azuma C., Saji F et Murata Y. (1997) Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: Regulation by decidual cytokine and steroid hormones. *Biol of Reprod.* **56**:1274-1280.

Sharkey A.M., Dellow K., Blayney M., Macnamee M., Charnock-Jones S. et Smith S.K. (1995) Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol. of Reprod.* **53**:955-962.

Shen M.M. et Leder P. (1992) Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8240-8244.

Shi Q.J., Lei Z.M., Rao ChV. et Lin J. (1993) Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*. **132**:1387-1395.

Simon C.A., Frances G.N., Piquette D.I. et Zurawski G., Dang W. et Polan M.L. (1994) Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist (see comments). *Endocrinol.* **134**:521-528.

Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M. et Rogers D. (1988) Inhibiting of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. **336(15)**:688-690.

Smith A.G. et Rathjen P.D. (1991) Embryonic stem cells, differentiation inhibiting activity, and the mouse embryo. *Semin. Dev. Biol.* **2**:317-327.

Smith A.G., Nichols J., Robertson M. et Rathjen P.D. (1992) Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. *Dev. Biol.* **151**:339-351.

Stahl J., Gearing D.P., Willson T.A., Brown M.A., King J.A. et Gough N.M. (1990) Structural organisation of the genes for murine and human leukemia inhibitory factor. *The J. of Biol. Chem.* **265(15)**:8833-8841.

Stewart C.L., Kaspar P., Brunet L.J., Bhatt H., Gadi I., Köntgen F. et Abbondanzo S.J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. **359**:76-79.

Stewart C.L. (1994) Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod. and Dev.* **39**:233-238.

Stewart C.L., Abbondanzo S.J. et Cullinan E.B. (1995) Régulation par les cytokines d'origine maternelle du développement pré-implantatoire et de la réceptivité utérine. *Contracept. Fertil. Sex.* **23(9)**:555-561.

Thibault C. et Levasseur M.-C. (1991a). La vie de l'oeuf avant l'implantation Chapitre 18 dans *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Éditeur Ménézo Y. et Renaud J.-P. INRA. Ellipses pp.339-357.

Thibault C. et Levasseur M.-C. (1991b). Développement et implantation du blastocyste. Chapitre 20 dans *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Éditeur Guillomot M., Fléchon J.-E. et Leroy F. INRA. Ellipses pp.377-402.

Thibault C. et Levasseur M.-C. (1991c). Rôle de tractus génital femelle dans les déplacements et la survie des gamètes et de l'oeuf fécondé. Chapitre 19 dans *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Éditeur Rousseau J.-P. et Ménézo. INRA. Ellipses pp.359-376.

Tomida M., Yamamoto-Yamaguchi Y. et Hozumi M. (1984) Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **259(17):10978-10982**.

Tortora G.J. et Anagnostakos N.P. (1988) Le développement embryonnaire et l'hérédité. dans: *Principes d'anatomie et de physiologie*. 5^e édition. Centre Educatif et Culturel Inc. Montréal. Québec. pp.788-812.

Vogiagis D., Marsh M.M., Fry R.C. et Salamonsen L.A. (1996) Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J. Endocrinol.* **148:95-102**.

Vogiagis D., Fry R.C., Sandeman R.M. et Salamonsen L.A. (1997) Leukaemia inhibitory factor in endometrium during oestrus cycle, early pregnancy and in ovariectomised stéroid-treated ewes. *J. Reprod. Fertil.* **109:279-288**.

Ware C.B., Horowitz M.C., Renshaw B.R., Hunt J.S., Liggitt D., Koblar S.A., Gliniak B.C., McKenna H.J., Papayannopoulou T., Thoma B., Cheng L., Donovan P.J., Peschon J.J., Bartlett P.F., Willis C.R., Wright B.D., Carpenter M.K., Davison B.L. et Gearing D.P. (1995) Targeted disruption of low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* **121:1283-1299**.

Williams L.R., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A. et Gough N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. **336(15)**:684-692.

Willson T.A., Metcalf D. et Gough N.M. (1992) Cross-species comparison of the sequence of the leukaemia inhibitory factor gene and its protein. *Eur. J. Biochem.* **204**:21-30.

Yagel S., Casper R.F., Powell R.S., Parhar R.S. et Lala P.K. (1989) Characterisation of pure human first trimester cytotrophoblast cells in long-term culture: growth pattern, markers, and hormone production. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **160**:938-945.

Yamamoto-Yamaguchi Y., Tomida M. et Hozumi M. (1986) Specific binding of a factor inducing differentiation to mouse myeloid leukemic M1 cells. *Experimental Cellular Research*. **164**:97-102.

Yang Z.-M., Le S.-P., Chen D.-B. et Harper M.J.K. (1994) Temporal and spatial expression of leukemia inhibitory factor in rabbit uterus during early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* **38**:148-152.

Yang Z.-M., Le S.-P., Chen D.-B., Cota J., Siero V., Yasukawa K. et Harper M.J.K. (1995) Leukemia inhibitory factor, LIF receptor, and gp130 in the mouse uterus during early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* **42**:407-414.

Yang Z.-M., Chen D.-B., Le S.-P. et Harper M.J.K. (1996) Differential hormonal regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) in rabbit and mouse uterus. *Mol. Reprod. Dev.* **43**:470-476.

Yoshinaga K. et Adams C.E. (1966) Delayed implantation in the spayed, progesterone-treated adult mouse. *J. Reprod. Fertil.* **12**:593-595.

ANNEXE

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

CONSTRUCTION DE PLASMIDE

La construction d'un plasmide comporte plusieurs étapes dont:

- La digestion du vecteur et de l'insert avec les enzymes appropriées.
- La déphosphorylation du vecteur pour éviter la recircularisation de ce dernier.
- La ligation des deux fragments.
- L'amplification de cette dernière par l'insertion du vecteur dans des bactéries.
- La validation des clones.
- L'amplification à grande échelle des clones désirés.

DÉPHOSPHORYLATION

1. Digérer 1-20 μg de plasmide avec les enzymes de restriction appropriées dans le tampon "One-Phor-All PLUS" dans un volume final de 50 μL .
 2. Inactiver les enzymes à la température appropriée.
 3. Diluer la phosphatase alcaline avec tampon "One-Phor-All PLUS" et de l'eau pour avoir une concentration de tampon (1X). Diluer une quantité suffisante pour ajouter 0,5 μL dans 10 μL .
 4. Ajouter 0,1 unité de phosphatase alcaline (1,5 μL de la dilution) au plasmide pré-digéré et incubé 45-60 minutes à 37°C.
 5. Inactiver la phosphatase alcaline 30 minutes à 85°C.
-

LIGATION

Trousse de ligation pGemT (Promega) ou autre vecteur.

1. La réaction se fait dans un tube eppendorf 1,5 mL pour un volume total de 10 μ L.
2. Prendre la quantité appropriée de la préparation du fragment d'ADN (insert).
3. Ajouter 0,5, 2 ou 4 μ L du vecteur approprié.
4. Ajouter 1 μ L du tampon de ligation 10 X (conc. finale 1 X).
5. Ajouter l'eau pour compléter le volume à 10 μ L (incluant l'enzyme) bien mélanger.
6. Ajouter 0,5 à 1 μ L de l'enzyme "T4 DNA ligase" (Pharmacia ou Promega) et brasser légèrement.
7. Incuber la réaction à 16°C pendant 2-16 heures.
8. On peut faire un contrôle avec un vecteur sans y ajouter d'insert.

TRANSFORMATION DANS DES CELLULES COMPÉTENTES (XL1-Bleu)

Solution:

X-Gal (Gold Biotechnologies Inc):

20 mg/mL diluer dans DMSO

IPTG (Gold Biotechnologies Inc):

200 mg/mL diluer dans l'H₂O

Procédure:

1. Dégeler les cellules (XL1-Blue) à température ambiante.
2. Après le dégel, déposer immédiatement dans la glace pour 10 minutes.

3. S'il s'agit d'une première transformation, on ajoute 200 μL de cellules pour chaque ligation. Pour une deuxième transformation, seulement 50 μL de cellules seront nécessaires pour 1 μL d'ADN prélevé d'une mini-prep.

N.B.: Pas plus de 100 ng d'ADN pour 200 μL de cellules.

4. Laisser dans la glace 30 minutes. Pour une deuxième transformation, on peut laisser 20 minutes.
5. "Heat shock" à 42°C pendant 30 secondes.
6. Mettre dans la glace 2 minutes.
7. Ajouter 4 volumes de milieu LB (800 μL).
8. Incuber à 37°C pendant 1 heure. Pour une deuxième transformation, on peut laisser 45 minutes.
9. Étaler 40 μL de X-GAL et 4 μL de IPTG sur chaque pétri ayant l'antibiotique approprié au vecteur (faire un pré-mix et étaler 44 μL du pré-mix).
10. Centrifuger et resuspendre dans 200 μL de LB (on ne centrifuge pas pour une deuxième transformation).
11. Ensemencer sur des pétris (2 pour chaque transformation) contenant du IPTG et du X-Gal
12. Incuber les pétris à 37°C pendant toute la nuit, placer la gélose en haut.

MINI-PRÉPARATION DE PLASMIDE

Solution:

Solution I: 50 mM glucose
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A

Cette solution se garde à 4°C.

Solution II: 0,2 N NaOH
1 % SDS

Solution III:	5 M acétate de potassium	60 mL
	acide acétique glacial	11,5 mL
	H ₂ O	28,5 mL

La solution finale est de 3M pour le potassium et 5M pour l'acétate.

Tampon de digestion (recette générale de 10 mL):

1 mL de Tris 1M pH 7,5
 1 mL de MgCl₂ 1M
 1 mL de BSA 10mg/mL
 x g de NaCl
 y mL de H₂O

N.B.: Le tampon de digestion "Low" contient 0 mM de NaCl, le tampon de digestion "Med" contient 50mM final de NaCl et le tampon de digestion "High" contient 100 mM final de NaCl.

Procédure:

1. Mettre 2 mL de milieu de culture contenant l'antibiotique approprié au vecteur utilisé dans un microtube de 2 mL.
2. Inoculer le 2 mL de milieu avec une colonie provenant d'un pétri de transformation et incuber avec agitation à 37°C pour la nuit.
3. Centrifuger 2 minutes à 14,000 RPM dans une microcentrifugeuse.
4. Enlever le surnageant par aspiration sous vide.
5. Resuspendre en vortexant le culot de bactéries dans 100 µL de Solution I froide.
6. Ajouter 200 µL de la Solution II fraîchement préparée.
7. Mélanger en inversant les tubes (ne pas vortexer).
8. Ajouter 150 µL de la Solution III froide.
9. Mélanger doucement en inversant les tubes; déposer-les sur la glace ou au réfrigérateur pendant 5 minutes.
10. Centrifuger pendant 5 minutes.
11. Transférer le surnageant (450 µL) dans un nouveau tube de 1 mL.
12. Ajouter 1 volume (450 µL) de phénol:chloroforme, mélanger au vortex.

13. Centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes, et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube de 1mL.
14. Ajouter 2 volumes d'éthanol 100% (900 μ l), mélanger au vortex et garder les tubes sur la glace 5 minutes.
15. Centrifuger pendant 5 minutes (si possible à 4°C).
16. Jeter le surnageant puis égoutter les tubes en les inversant sur un papier buvard.
17. Ajouter 1 ml d'éthanol 75%, mélanger au vortex.
18. Centrifuger 5 minutes.
19. Jeter le surnageant et sécher les culots au lyophilisateur ou inverser sur du papier buvard.
20. Resuspendre le culot dans 50 μ L de TE pH 8,0 (ou eau) contenant de la RNase pancréatique DNase-Free (20 μ g/mL). Mélanger au vortex.
21. Prendre 5 μ L de la préparation pour la digestion avec une enzyme de restriction.
22. Garder l'ADN à -20°C.

Digestion:

1. Ajouter séquentiellement:
 - X μ L d'ADN
 - 3 μ L de tampon approprié
 - 10-20 U d'enzyme désiré
 - Y μ L H₂O stérile
 - 30 μ L total
2. Mettre 1 heure à 37°C.
3. Mettre sur gel d'agarose de 1 %.

MAXI-PRÉPARATION DE PLASMIDE

Référence: Sambrook 1989 " MOLECULAR CLONING" 1.33-1.39

Solution:

Sln A: 25 % Sucrose
50 mM Tris (ph 8,0)
1 mM EDTA

Sln B: 50 mM Tris (pH 8,0)
5 % Triton X-100
1 mM EDTA

Procédure:

Le protocole est conçu pour 250 mL de culture, pour l'utilisation d'un plus grand volume de culture il faudra réajuster les volumes des solutions ajoutées.

1. Inoculer 250 mL de milieu contenant l'antibiotique approprié avec une colonie provenant d'une deuxième transformation ou de culture liquide et incuber toute la nuit à 37°C avec agitation.
2. Centrifuger le bouillon de culture dans des bouteilles pendant 10 minutes (4°C) à une vitesse de 5 000 RPM (rotor JA-14 Beckman).
3. Enlever le surnageant et déposer les bouteilles sur la glace.
4. Resuspendre le culot de bactéries dans 5 mL de la Sln A froide.
5. Transférer le culot resuspendu dans un tube de 15 ml stérile.
6. Laver le reste du culot avec 2,5 mL de EDTA 0,5 M et transférer ce liquide dans un tube de 15 mL.
7. Additionner, dans chaque tube de 15 mL, 15 mg de lysozyme (Sigma).
8. Inverser les tubes et incuber 30 minutes sur la glace.
9. Lyser des bactéries avec la Sln B chaude:
Faire chauffer la Sln B presque jusqu'à ébullition. Pour chaque tube de 15 mL ajouter de la Sln B jusqu'à un volume total de 12 mL. Placer le tube dans l'eau bouillante pendant 1 minute; ensuite immédiatement le déposer sur la glace.

10. Verser le contenu des tubes de 15 mL dans des tubes à centrifuger de catégorie Oak Ridge (rotor JA-21 Beckman).

N.B.: À ce moment la solution devient visqueuse; cela est dû au relâchement de l'ADN génomique.

11. Centrifuger à 20,000 g pendant 1 heure.
12. Vider le surnageant dans un nouveau tube de 15 mL stérile.
13. Ajuster le volume pour chaque tube à 11 ml avec du TE pH 8,0.
14. Ajouter 11 g de CsCl_2 (concentration finale 1g/mL), mélanger pour obtenir une solution homogène. Laisser reposer.
15. Prendre les tubes à ultracentrifugation (Beckman) d'une capacité de 10 mL et y mettre une pipette pasteur, ajouter 0,2 mL de bromure d'éthidium dans chaque tube.
16. Ajouter, avec une pipette pasteur, la solution contenant l'ADN dans le tube d'ultracentrifugation correspondant, en évitant de prélever la couche supérieure de la solution car elle contient la majorité des protéines.
17. Centrifuger à 50 000 RPM (NVT-65 de Beckman) pendant 15 heures c'est-à-dire toute la nuit (bien équilibrer les tubes).

L'extraction du plasmide:

Attention!!! manipulation avec du bromure d'éthidium (porter des gants et protéger la surface de travail avec un piqué).

On devrait apercevoir un culot au fond du tube correspondant à l'ARN, une bande au milieu qui est l'ADN plasmidique (il peut parfois apparaître une faible bande au dessus de l'ADN plasmidique qui correspond à l'ADN génomique) et finalement les protéines se situent sur la couche supérieure à surface du liquide.

1. Insérer une seringue de 3-5 cc avec une aiguille de 18 gauge sous la bande d'ADN plasmidique et couper la partie supérieure du tube à l'aide de pince.
2. Prélever la bande correspondant à l'ADN plasmidique.
3. Transférer le contenu de la seringue dans un tube de 15 mL stérile et noter le volume initial.

4. Remplir le tube de 15 mL avec du 1-butanol, afin d'éliminer le bromure d'éthidium.
5. Mélanger en inversant le tube, enlever par aspiration sous vide la phase supérieure jusqu'à l'interphase (la phase aqueuse est plus dense que le butanol). Réajuster le volume initial avec du TE pH 8,0 ou de l'eau stérile.
6. Refaire l'étape 22 jusqu'à l'obtention d'une solution claire (pas rougeâtre). Enlever les dernières traces de butanol à l'aide d'une pipette.
7. Ajouter, dans le même tube de 15 mL, 2 fois le volume d'eau. Brasser et transférer le liquide dans un nouveau tube de 50 mL stérile. Noter le nouveau volume initial, ajouter deux fois ce volume d'éthanol 100% et 0,1 fois le volume initial de Na-acétate 3M pH 5,2 (pas toujours nécessaire à cause de la forte concentration de CsCl₂).
8. Brasser vigoureusement et placer à -20°C pour 1 heure ou 15 minutes à -70°C.
9. Centrifuger à 3 500 RPM (rotor GH 3,7 Beckman) pendant 15 minutes.
10. Jeter le surnageant et laisser égoutter les tubes en les inversant sur un papier brun.
11. Resuspendre le culot dans 400 µL de TE pH 8,0 (c'est-à-dire 2 fois 200 µL) et le transférer dans un eppendorf de 1,5 mL.
12. Ajouter 1 volume de phénol:chloroforme (400 µL), mélanger au vortex.
13. Centrifuger pendant 5 minutes et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube de 1,5 mL.
14. Refaire les étapes 12 et 13.
15. Ajouter 2 volumes d'éthanol 100% et 0,1 volume de Na-acétate 3,0 M pH 5,2, afin de précipiter l'ADN.
16. Centrifuger pendant 5 minutes à 4°C.
17. Jeter le surnageant et sécher le culot au lyophilisateur ou à température de la pièce en inversant les tubes sur du papier buvard.
18. Resuspendre le culot dans 400 µL de TE pH 8,0.
19. Prendre la densité optique (D.O.) pour connaître la concentration de l'ADN dans l'échantillon. Prendre 5 µL de la solution de plasmide dans 495 µL d'eau (facteur de dilution 1:100), lire D.O. à 260/280 nm. Calculer la concentration en sachant que 1 D.O. = 50 µg/mL.

$$\frac{\text{D.O. à 260 nm} \times \text{facteur de dilution} \times 50 \mu\text{g}}{10^{-3} \text{ mL}} = \text{Concentration } \mu\text{g/mL}$$
20. Conserver l'ADN à -20°C.

8. Extraction au Phénol/Chloroforme: Ajouter 0,7 mL de Phénol/Chloroforme et agiter **délicatement** par inversion ou dans le four à hybridation pour environ 1 heure.
9. Centrifuger à 4°C pour 15 minutes à 3 500 RPM (rotor GH 3,7 Beckman) et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube de 15 mL. Le phénol est plus dense que l'eau, il se retrouve donc au fond.
10. Précipitation: Ajouter de façon séquentielle 70 µL de NaOAC 3M (pH 5.2), 1,4 mL d'éthanol 100%, inverser plusieurs fois. Il devrait se former comme un nuage blanc dans la solution ce qui correspond à l'ADN. Retirer cet amas et le transférer dans un tube eppendorf de 1,5 mL.
11. Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 75%.
12. Centrifuger dans un microcentrifugeuse à 4°C pour 5 minutes à 14 000 RPM.
13. Laisser sécher en inversant le tube sur un papier buvard et resuspendre toute la nuit le culot dans un volume de TE approprié pour la dimension du culot, si nécessaire, on peut incubé à 55°C.
14. Évaluer la concentration d'ADN en prenant une lecture de la densité optique (D.O.) à 260 et 280 nm sur l'échantillon dilué à 5 µL de l'échantillon dans 495 µL H₂O (correspondant à une dilution de 100X) (1 D.O. = 50 µg/mL).

AMICON ET CENTRICON

Solution et matériel:

1. Trousse de Centrilitor Micro-electroelutor (Amicon).
2. Trousse Centricon Concentrator (Amicon).
3. Tampon TAE 10X: Tris
Acide Acétique
EDTA

4. Colorant 6X: 0,25% Bromophenol bleu (Lower migre environ 300 pb)
0,25% Xylène cyanol (Upper migre environ 4 Kb)
30% Glycérol
Diluer dans l'H₂O

Procédure:**Électroéluion:**

1. Procéder à la digestion de l'ADN génomique avec les enzymes de restriction appropriées.
2. Faire la migration sur un gel d'agarose de 1%.
3. Après la migration, couper le fragment de la grandeur qui nous intéresse et le couper en morceaux plus petit.
4. Insérer les morceaux dans le microtube fourni par la compagnie.
5. Faire le montage tel qu'indiqué par la compagnie.

N.B.: Il faut s'assurer qu'il ne reste plus de bulle en dessous des tubes "Centricon Concentrator". Utiliser une pipette pasteur pliée à 45° pour rejoindre le dessous.

6. Faire l'électroéluion de l'ADN quelques heures à 90-100 volts ou toute la nuit à 50 volts.
7. Enlever le tampon de chambre supérieure et retirer le microtube contenant le gel et vérifier les morceaux de gel pour s'assurer que l'ADN soit complètement sorti.
8. Retirer les tubes "Centricon Concentrators" de l'appareil de migration.

Concentration:

9. Insérer le tube "Centricon Concentrator" contenant la solution d'ADN dans un tube réservoir. Ajouter le tube de récupération d'ADN sur le dessus du montage pour éviter l'évaporation.
10. Centrifuger à 1000 g pour 30 minutes.
11. Séparer le tube "Centricon Concentrator" des 2 autres tubes.
12. Inverser le tube "Centricon Concentrator" sur le tube de récupération de façon à obtenir le dessus de la membrane vers le tube de récupération.
13. Ajouter de l'H₂O ou du TE sur le dessous de la membrane (rendu sur le dessus à cause de l'inversion du tube) et centrifuger à 1 000 g pour 5 minutes.
14. Retirer le tube "Centricon Concentrator" et garder le filtrat pour usage ultérieur.

PRÉPARATION DES OLIGONUCLÉOTIDES POUR LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

1. Ajouter 500 μL de Tris 10 mM pH 8,0.
2. Faire des aliquots de 20 mM selon le calcul suivant:

$$1 \text{ nM} = 1 \times 10^{-3} \mu\text{Mol}$$

ex.: $34.4 \text{ nM} = 34.4 \times 10^{-3} \mu\text{Mol}$

$$34.4 \times 10^{-3} \quad / \quad 0,5 \text{ mL}$$

$$\text{X} \quad / \quad 1000 \text{ mL} = 68,8 \mu\text{Molaire} (\mu\text{M})$$

$$\frac{68.8 \mu\text{M}}{20 \mu\text{M}} = 3.44 \text{ X (nombre de fois trop concentré)}$$

$$20 \mu\text{M}$$

$$\frac{100 \mu\text{L (volume désiré)}}{3,44 \text{ (nombre de fois trop concentré)}} = 29 \mu\text{L de sln stock} + 71 \mu\text{L de Tris 10 mM pH8,0}$$

PRÉPARATION DES NUCLÉOTIDES DEAZA G

N.B.: Les nucléotides Deaza G sont utilisés pour amplifier par PCR des régions riches en G-C.

1. Diluer 1:10 les nucléotides G 100 mM pour ainsi obtenir une concentration de 10 mM.
2. Ajouter séquentiellement:

- 1,3 μL de dATP	100 mM
- 1,3 μL de dCTP	100 mM
- 1,3 μL de dTTP	100 mM
- 3,1 μL de dGTP	10 mM
-18,8 μL de Deaza GTP	5 mM
-24,2 μL d' H_2O	
50 μL total	

3. Ajouter 2 μL de cette solution pour remplacer 1 μL de dNTP (Pharmacia) 100 mM utilisé lors d'une réaction de PCR normale.

RÉACTION DE PCR

- N.B. : -Travailler avec des gants et dans le local de PCR pour éviter la contamination.
-Allumer le bain sèche à 85°C.

Préparation de la réaction:

1. La réaction se fait dans des microtubes de 0,5 mL pour un volume total de 100 μL .
Réactifs: -10 μL de tampon PCR 10 X
 - 1 μL de dNTP
 - 1 μL amorce sens (20 μM)
 - 1 μL amorce anti-sens (20 μM)
 - X μL ADN (0,5-2 μg)
 - Y μL H₂O stérile
 95,5 μL volume total
2. Ajouter 50 à 75 μL d'huile minérale.
3. Placer les microtubes dans le bain sèche.
4. Préparer le programme et le débiter pour arrêter le programme lorsque l'appareil a atteint 80-82°C.
5. Ajouter 0,5 μL de l'enzyme polymérase (TAQ de Cétus ou Expand hight fidelity de Boehringer) dans chaque échantillon.
6. Mettre les microtubes dans l'appareil et redémarrer le programme.

Préparation de l'appareil:

1. Allumer l'appareil et attendre que le réfrigérateur soit à 15°C.

2. Programmer l'expérience, chaque cycle doit comprendre:
 - 45 secondes à 95°C (dénaturation)
 - 45 secondes à X°C (alignement des amorces)
 - 1,5-3 minutes à 72°C (polymérisation, dépend de la longueur des fragments)on répète ce cycle environ 30 à 40 fois
3. Assurez-vous qu'il reste assez d'huile dans le tube contenant la sonde qui détecte la température.

N.B.: L'enzyme Expand, nécessite une température d'élongation (polymérisation) de 70°C.

Analyse:

1. Mettre 25-30 µL de la réaction de PCR sur un gel d'agarose de 1% (1,5 à 2 % si les fragments sont plus petits), ne pas oublier de mettre un marqueur de poids moléculaire.

LIGATION D'UN PRODUIT DE PCR

Préparation du fragment:

1. Après avoir vérifié le PCR, mettre 60 µL de la réaction de PCR sur un gel d'agarose 1 % (pour la technique Sephaglass Band Prep de Pharmacia) ou sur un gel de 0,8 % (pour la technique Amicon), et faire migrer à 115-120 volts pendant 45 minutes.
2. Couper la bande qui nous intéresse.
3. Purifier le fragment à l'aide du matériel de Pharmacia " Sephaglass Band Prep" ou encore avec le système Amicon en suivant les instructions du fabricant.
4. Évaluer la quantité d'ADN purifié en déposant 1 µL de la récupération sur un gel d'agarose de 1%.

Band prep à partir d'un gel:**Solution:**

1. "Gel Solubilizer": NaI 6 M dans Tris 10 mM pH 8,0
2. "Wash Buffer": 20 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
0,1 mM NaCl
18 mL d'éthanol

Protocole:

1. Couper la bande à extraire et mettre dans un microtube de 1,5 mL.
2. Ajouter la solution NaI "Gel Solubilizer" pour couvrir l'agarose (environ 1 μ L/mg d'agarose) et laisser dissoudre le gel à 60°C.
3. Agiter le tube contenant la matrice "Sephaglas BP" pour obtenir une suspension uniforme. Ajouter la matrice (5 μ L/ μ g d'ADN estimé) à la solution de gel dissoute et vortexer. Incuber 5 minutes à température de la pièce. Agiter le tube à chaque minute.
4. Centrifuger le tube 1 minute à vitesse maximum dans une microcentrifugeuse et retirer le surnageant en prenant bien soin de ne pas déranger le culot.
5. Ajouter la solution de lavage "wash Buffer" 8X le volume de "Sephaglas" ajouté et resuspendre délicatement le culot.
6. Centrifuger le tube pour 1 minute à vitesse maximum dans une microcentrifugeuse.
7. Reprendre les étapes 5 et 6 pour faire 2 autres lavages de la matrice.
8. Une fois le maximum de solution de lavage enlevé, inverser les tubes sur du papier buvard et laisser sécher 10 minutes.
9. Ajouter de l'H₂O, 2X le volume de matrice "Sephaglas" ajouter au départ et incubé le tout à la température de la pièce pour 5 minutes en agitant le tube périodiquement.
10. Centrifuger le tube à vitesse maximum dans une microcentrifugeuse pour 1 minute et récupérer le culot qui sera mis dans un tube de 1,5 mL propre.
11. Reprendre les étapes 9 et 10 et mettre le surnageant dans le même tube de 1,5 mL.

12. Pour évaluer la concentration, mettre 1 à 4 μL de la récupération (Band prep) sur gel d'agarose 1 %.

Amicon:

1. Couper la bande à extraire et mettre dans un microtube de 1,5 mL.
2. Assembler le "gel nebulizer" et "micropure-0,22" avec le microtube fourni par le manufacturier.
3. Placer le gel dans le "gel nebulizer" et centrifuger 1 minute à 13 000 RPM dans une microcentrifugeuse.
4. Retirer et jeter le "gel nebulizer" et le "micropur-0,22".
5. Pipetter la solution dans un Microcon-100 et insérer dans un autre microtube (peut utiliser le même qu'en 2).
6. Centrifuger 15 minutes à 2 500 RPM dans une microcentrifugeuse à la température de la pièce.
7. Centrifuger 3 minutes à 3 500 RPM dans une microcentrifugeuse.

Ligation:

La réaction générale est comme décrite plus haut mais certaines modifications sont apportées:

1. Prendre le volume maximum du fragment d'ADN soit 8 μL (ou 50 ng d'ADN).
2. Ajouter 0,5 μL du vecteur pGem-T de Promega (si on utilise la TAQ de Cétus).
3. Ajouter 1 μL du tampon de ligation 10 X (concentration finale 1 X).

PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ARN_m À PARTIR DE TISSUS

Référence:

1. Chomczynski P. et Sacchi N., 1987.
2. Puissant C. et Houdebine L.-M., 1990.
3. Chirgwin J.M. et *al.*, 1979.

N.B.: Tout le matériel doit être RNase free, c'est-à-dire que le matériel solide doit être stérilisé 45 minutes à l'autoclave et le matériel liquide doit être traité avec DEPC et autoclavé 45 minutes.

Solution:

1. Solution D (dénaturante):

		Concentration finale
50 g	Guanidium thiocyanate	4 M
0,5 g	Na N-laurylsarcosine	0,5%
2,5 mL	1 M Na Citrate, pH 7,0	25 mM

Vérifier si le pH est au environ de 7,0 avec du papier pH et ajuster avec 1N NaOH si nécessaire. Ajouter l'H₂O-DEPC jusqu'à 100 ml. Filtrer avec un papier Whatman No.1 pour enlever les particules insolubles. Séparer en aliquots de 50 mL.

Juste avant de procéder à l'homogénéisation du tissu, rajouter 350 µL de 2β-mercaptoéthanol (0,1 M concentration finale).

N.B.: La solution D sans β-mercaptoéthanol se conserve pendant 3 mois à la température de la pièce et avec β-mercaptoéthanol environ 1 mois.

2. 2M Na Acétate, pH4,0 (à préparer dans la vaisselle RNase free).

3. Phénol acide (saturé avec de l'eau; phénol acide pH 4-5 permet une meilleure extraction de l'ADN dans la phase phénolique).
4. Chloroforme:alcool isoamyl (49:1).
5. Azote liquide (pour garder les tissus congelés).

Procédure:

N.B.: Pour l'ensemble des manipulations il est préférable de toujours travailler avec des gants et sur glace.

1. Mettre la sonde dans le peroxyde 3% et préparer les tubes:
 - 2 tubes de 50 mL pour chaque tissu.
 - 2 séries de 4 tubes de polypropylène "loose cap" pour chaque tissu.
 - 2 eppendorfs de 1,5 mL pour chaque tissu.
2. Peser 2 g de tissu. S'assurer que le tissu ne dégèle pas, donc le laisser dans l'azote liquide jusqu'à ce que l'on soit prêt à l'homogénéiser dans la solution D + β -mercaptoéthanol.
3. Immédiatement transférer le 2 g de tissu dans un tube de 50 mL polypropylène stérile et ajouter 20 mL de solution D contenant le β -mercaptoéthanol (1 g tissu/10 mL de solution D).
4. Homogénéiser à une vitesse de 15 000 RPM avec le polytron, pendant environ 15 à 30 secondes.

N.B.: Prendre soin de nettoyer la sonde (eau-DEPC/éthanol/eau-DEPC) avant de réaliser l'homogénat).

5. Ajouter séquentiellement à l'homogénat :
 - 2 mL 2M-Na Acétate, pH 4,0
 - 20 mL phénol acide (H₂O saturé)
 - 8 mL Chloroforme:alcool isoamyl (49:1)
6. Transférer la moitié du mélange dans un autre tube de 50 mL polypropylène stérile. Mélanger vigoureusement sur le vortex pendant environ 15 secondes et déposer sur la glace.

7. Transférer le contenu dans des tubes de 15 mL de polypropylène loose cap (4 tubes pour chaque tissu).
8. Centrifuger pendant 20 minutes à 4°C, 7 000 RPM (rotor JA-20 Beckman) (L'ARNm est dans la phase aqueuse sur le dessus. À l'interface entre la phase aqueuse et organique, on retrouve les protéines précipitées. L'ADN et les protéines se retrouvent dans la phase organique).

Précipitation:

9. Transférer (environ 5 mL) la phase aqueuse dans des tubes de 15 mL en polypropylène loose cap.

N.B.: Laisser un peu de solution au dessus de l'interphase afin d'éviter ainsi de contaminer la phase aqueuse.

10. Ajouter un volume égal d'isopropanol et placer à -20°C toute la nuit à -20°C.

N.B.: Apparence très flocculente.

11. Centrifuger pendant 20 minutes à 4°C, 7 000 RPM (rotor JA-20 Beckman).

Deuxième extraction:

12. Resuspendre le culot avec 400 µL de solution D dans un tube et utiliser ce même liquide pour resuspendre un deuxième culot dans un autre tube et finalement transférer le liquide dans un microtube de 2 mL (deux tubes de 15 mL en polypropylène pour un microtube de 2 mL). Laver les tubes avec 400 µL de solution D et transférer la solution dans le même tube de 2 mL contenant déjà 400 µL.

13. Ajouter séquentiellement
 - 80 µL 2M Na Acétate pH 4
 - 800 µL phénol saturé H₂O
 - 260-300 µL chloroforme-alcool isoamylmélanger par inversion

14. Vortexer vigoureusement 10 secondes et déposer sur la glace pour 15 minutes.
15. Centrifuger dans une microcentrifugeuse à 4°C pendant 15 minutes.
16. Transférer la phase aqueuse (sans interphase) dans un nouvel eppendorf de 2 mL.
17. Ajouter 1 volume d'isopropanol (environ 800 µL), mélanger et placer à -20°C toute la nuit.
18. Centrifuger pendant 20 minutes à 4°C.
19. Jeter le surnageant et sécher le culot en inversant le tube sur du papier buvard.
20. Dissoudre le culot d'ARN dans 30-35 µL H₂O-DEPC (en fonction du volume du culot). Chauffer l'échantillon à 65°C pour environ 10 à 30 minutes en mélangeant fréquemment afin de dissoudre le culot.

N.B.: Le culot devient transparent; il est peu visible, donc s'assurer de sa dissolution avant de prendre la D.O.

21. Évaluer la quantité de la préparation de l'ARN soit une D.O. 260/280 nm sur l'échantillon dilué (1:250; 2 µL + 498 µL H₂O). La valeur de la lecture devrait être située entre 1,6 et 1,9 (si >2, rediluer l'échantillon d'ARN et reprendre une mesure).
22. Évaluer la concentration d'ARN à 260 nm (1 D.O. = 40 µg/mL)

Qualité de l'ARN:

23. Préparer l'échantillon comme suit:
 - 2 µL de l'échantillon
 - 12,5 µL de Formaldéhyde 37%
 - 4 µL de Formamylde
 - 2,5 µL de MOPS

Faire chauffer le tout à 65-70°C pour 10 minutes pour dénaturer l'ARN. Ajouter le colorant 6X pour donner une concentration de 1X.

24. Charger le mélange contenant l'ARN sur gel d'agarose 1% pour ARN.
 - Faire chauffer 84 mL H₂O avec 1 g d'agarose
 - Ajouter 6 mL Formaldéhyde 37% et 10 ml MOPS
25. Faire migrer 90 volts 1-3 heures.
26. Ranger l'ARN à -70°C

ISOLATION D'ARN À PARTIR DE CULTURE CELLULAIRE

Solution:

Idem que pour "PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ARNm À PARTIR DE TISSUS"

Protocole:

Extraction:

1. Ajouter 1,5 mL de Sln D par puit (plaque de 6 puits de 3,5 cm)
2. Laisser sur la glace environ 30 minutes. Préparer 2 séries de 2 tubes de 15 mL en polypropylène "loose cap" .
3. Récupérer la solution à l'aide de pipetteman et embouts et la transférer dans un tube de 50 mL.
4. Ajouter séquentiellement:
 - 9 mL de phénol acide
 - 900 µL de NaOAC 2M pH 4
 - 3,6 mL de Chloroforme:isoamyl
5. Passer le mélange au vortex environ 15 secondes et aliquoter dans 2 tubes de 15 mL en polypropylène "loose cap".
6. Centrifuger à 4°C pour 20 minutes à 7 000 RPM (rotor JA-20 Beckman).

Précipitation:

7. Enlever le surnageant (environ 5 mL) et transférer dans un tube de 15 mL en polypropylène "loose cap" propre.
 8. Ajouter la même quantité d'isopropanol et laisser à -20°C toute la nuit.
-

Deuxième extraction:

9. Centrifuger les tubes à 4°C pour 20 minutes à 7 000 RPM (rotor JA-20 Beckman).
10. Resuspendre le culot dans 200 µL de Sln D et transférer dans un eppendorf de 2 mL. Rincer le tube de polypropylène avec un autre 200 µL de Sln D et mettre dans le tube de 2mL contenant déjà 200 µL.
11. Ajouter séquentiellement:
 - 40 µL de NaOAC
 - 400 µL de Phénol acide
 - 160 µL de Chloroforme:isoamyl
12. Vortexer et laisser sur la glace 15 minutes.
13. Centrifuger dans une microcentrifugeuse à 4°C pour 15 minutes à 14 000 RPM.
14. Laver le culot avec 500 µL d'éthanol 75%, vortexer et centrifuger à 4°C pour 5 minutes à 14 000 RPM dans une microcentrifugeuse.
15. Dissoudre le culot d'ARN dans 30-35 µL H₂O-DEPC (en fonction du volume du culot). Chauffer l'échantillon à 65°C pour environ 10 à 30 minutes en mélangeant fréquemment afin de dissoudre le culot.

N.B.: Le culot devient transparent; il est peu visible, donc s'assurer de sa dissolution avant de prendre la D.O.

16. Évaluer la quantité de la préparation de l'ARN soit une D.O. 260/280 nm sur l'échantillon dilué (1:250; 2 µL + 498 µL H₂O). La valeur de la lecture devrait être située entre 1,6 et 1,9 (si >2, rediluer l'échantillon d'ARN et reprendre une mesure).
17. Évaluer la concentration d'ARN à 260 nm (1 D.O. = 40 µg/mL).

Qualité de l'ARN:

18. Préparer l'échantillon comme suit:
 - 2 µL de l'échantillon
 - 12,5 µL de Formaldéhyde 37%
 - 4 µL de Formamylde
 - 2,5 µL de MOPS

19. Faire chauffer le tout à 65-70°C pour 10 minutes pour dénaturer l'ARN. Ajouter le colorant 6X pour donner une concentration de 1X.
20. Charger le mélange contenant l'ARN sur gel d'agarose 1% pour ARN.
Faire chauffer 84 mL H₂O avec 1 g d'agarose
Ajouter 6 mL Formaldéhyde 37% et 10 mL MOPS
21. Faire migrer 90 volts 1-3 heures.
22. Ranger l'ARN à -70°C

ISOLATION d'ARN POLY (A)⁺

Référence: Protocole tiré du manuel dans le kit
Dynabeads Oligo (dT)25

Matériel requis:

-Dynabeads Oligo (dT)25.

-Portoir avec aimant.

- "Binding Buffer" 2X: 20 mM Tris-HCl pH7,5
 1 mM LiCl
 2 mM EDTA

- "Washing Buffer" 1X: 10 mM Tris-HCl pH7,5
 0,15 mM LiCl
 1,0 mM EDTA

- "Elution Buffer" 1X: 2 mM EDTA

-Bain sèche à 65°C.

-Pipetteman et embouts RNase free.

-Eau DEPC

Protocole:

On isole 2 à 5% d'ARN poly(A)⁺ à partir de 75 µg d'ARN total. Pour cette quantité on a besoin de 0,2 mL de billes "Dynabeads Oligo (dT)25". Donc si c'est pour un Northern Blot et que l'on veut environ 10 µg d'ARN poly(A)⁺, on doit avoir 300 µg d'ARN total et 0,8 mL de billes. Le protocole sera fait pour l'isolation de 10 µg de poly(A)⁺.

1. Bien agiter le tube contenant les billes pour obtenir une solution homogène.
2. Prélever 0,8 mL de billes "Dynabeads Oligo (dT)25" et placer le tube dans le portoir avec aimant. Attendre 30 secondes.
3. Enlever le surnageant en prenant soin de ne pas toucher les billes avec l'embout et laver une fois avec 400 µL de Binding Buffer 2X.
4. Enlever le surnageant et ajouter 400 µL de Binding Buffer 2X. Les billes sont maintenant prêtes à être utilisées.
5. Préparation du matériel d'ARN: faire chauffer à 65°C le tube contenant l'ARN total pendant 2 minutes. Prélever la quantité pour avoir 300 µg et la déposer dans le tube contenant les billes, ajuster le volume avec de l'eau pour obtenir une quantité de 400 µL total avec l'ARN.
6. Incuber 10 minutes à la température de la pièce.
7. Placer le tube dans le portoir avec aimant pendant 30 secondes et retirer le surnageant. Laver deux fois avec 800 µL de Washing Buffer 1X. Il est important de bien retirer tout le surnageant car l'élution se fait à partir d'un petit volume.
8. Ajouter 20 µL d'élution Buffer 1X. Incuber à 65°C pendant 2 minutes et placer immédiatement dans le portoir avec aimant. Retirer le surnageant et le garder sur la glace.

Regénération des billes:

9. Resuspendre les billes dans 800 µL de 0,1 M NaOH dans le même tube eppendorf.
10. Chauffer à 65°C pendant 2 minutes. Enlever le surnageant, à l'aide du portoir avec aimant. Refaire les étapes 9 et 10.

11. Resuspendre les billes dans 800 μL de 0,1 M NaOH et transférer ce liquide dans un nouveau tube eppendorf.
12. Chauffer à 65°C pendant 2 minutes et retirer le surnageant. Resuspendre les billes avec 400 μL de Binding Buffer 2X.
13. Retirer le surnageant et laver avec 400 μL de Binding Buffer 2X. Refaire cette étape deux fois.
14. Resuspendre avec 400 μL de Binding Buffer et garder les billes à 4°C.

N.B.: On peut réutiliser les billes jusqu'à 5 fois, lorsque l'on utilise les billes, après la régénération on l'indique en apposant un X sur le côté du tube. Après les 5 utilisations, on ne jète pas les tubes, ils peuvent servir à d'autres buts.

TRANSCRIPTION INVERSE DE LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR)

N.B.: -Travailler avec des gants et toujours garder les tubes sur la glace.
-Trousse de SuperScript II RNase H⁻ Reverse transcriptase (Gibco/BRL).

Solution:

1. Tampon "First strand buffer" 5X fourni par Gibco/BRL.
2. DTT 0,1 M fourni par Gibco/BRL.
3. dNTP 10 mM (mélange de chaque base A,C, G,T à 10 mM chacune)
4. H₂O-DEPC

Transcription inverse:

1. Chauffer le tube d'ARN à 65-70°C pendant 3-5 minutes et ensuite placer sur la glace.
2. Préparer Tube 1:

X μL d'ARN (ou 1 μg ARN poly A)
1 μL d'amorce Antisense
<u>Y μL</u> dH ₂ O
10 μL total

3. Mettre dans le bain sèche 10 minutes à 70°C.
4. Tube 2 (pour chaque RT):

- 10,5 µL	H ₂ O-DEPC
- 7,2 µL	Tampon 5X
- 2,4 µL	DTT
- 1,5 µL	dNTP
- 1,2 µL	RNAsine
- 1,2 µL	Super Script (Enzyme transcriptase inverse de Gibco/BRL)
5. Après l'incubation du tube 1, le refroidir sur la glace et y ajouter 20 µL du tube 2.
6. Incuber le tout à 50°C pour 1 heure.

Conditions du PCR:

Voir la section PCR plus haut

TRANSFERT D'ADN PAR BUVARDAGE ("Southern Blots")

Solutions:

Solution de HCl:	250 mM de HCl
Solution de Dénaturation 1:	0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl
Solution de Neutralisation 1:	0,5 M Tris-HCl pH7,5; 3 M NaCl
Solution de transfert (20X SSC):	3 M NaCl, 300 mM citrate de sodium pH7,0

Protocole:

1. Digestion de 10 µg d'ADN dans un tampon approprié pour un volume total de 40 µL (10 % de tampon). La digestion se fait à 37°C pendant la nuit ou pour 3-4 heures.

Migration des échantillons:

2. Les échantillons et le marqueur de poids moléculaire devraient être séparés sur un gel d'agarose 0,8 % à un voltage de 90-100 volts pendant 2-3 heures, le tampon de migration sera du TAE 1X. La migration se fait jusqu'à ce que les deux colorants séparent le gel en trois.
3. Prendre une photographie en plaçant sur le côté du gel une règle à partir du début des puits afin de calculer la migration par rapport aux marqueurs de poids moléculaire. Enregistrer la photo sur l'ordinateur.

Préparation du gel pour le transfert:

4. Placer le gel dans une solution de 0,25 M HCl pendant 7 minutes.
5. Rincer le gel deux fois avec de l'eau distillée.
6. Couper légèrement le coin droit en bas (ADN vers le haut).
7. Faire une dénaturation avec 2 incubations de 15 minutes dans la solution de dénaturation.
8. Neutraliser le gel avec un solution de neutralisation pour 2 fois 15 minutes.

Installation de l'appareil de transfert:

9. Utiliser un plat en pyrex et déposer au fond le portoir ayant servi à la migration du gel.
10. Couper 3 papiers Whatman 3 M de la même grandeur que le gel (prendre la grandeur du portoir) et 1 papier Watmam 3 M de même longueur mais deux fois sa largeur.

11. Déposer le plus grand papier sur le portoir dans le plat et vider 500 mL d'une solution SSC 20X.
12. Enlever les bulles d'air du papier buvard en faisant rouler une pipette pasteur.
13. Déposer le gel de façon à ce que l'ouverture des puits soit vers le bas.
14. Déposer la membrane de nylon Hybond-N (Amersham Life Science) chargée positivement (couper le coin droit en bas) sur le gel en prenant soin d'aligner le haut de la membrane avec les puits afin de connaître le début de la migration.

N.B.: Ne pas oublier de placer les deux coins coupés sur le même côté. Le transfert débute immédiatement lorsque l'on appose la membrane sur le gel.

15. Mettre les deux autres papiers buvards et une pile de papiers buvard (essuie-tout) sur le dessus. Pour éviter que le liquide monte directement au papier buvard on met une couche de pellicule transparente entre la pile de papier buvard et la membrane de nylon.
16. Le transfert s'effectue par capillarité durant toute la nuit (après 4 heures le transfert peut être considéré comme complet).

Fixation de l'ADN à la membrane:

17. On fixe l'ADN à la membrane grâce aux rayons U.V. Placer la membrane avec l'ADN face vers le haut dans l'appareil Gene linker et choisir le programme 3 (150 KiloJoules), ensuite, tourner la membrane et répéter.

Préhybridation et Hybridation:

Voir protocole d'hybridation d'ADN et ARN

MARQUAGE D'UNE SONDE RADIOACTIVE

Protocole:

1. Purifier (2 fois) le fragment d'ADN à l'aide du matériel de Pharmacia "Sephaglass Band Prep".
2. Évaluer la concentration d'ADN, et prendre la quantité nécessaire pour obtenir 50 ng d'ADN. La réaction se fait dans un tube vissable de 1,5 mL et à l'aide du matériel de Pharmacia, "T7 Quick Prime Kit".
3. Compléter la quantité d'ADN prélevée avec de l'eau pour obtenir un volume final 34 μ L.
4. Ajouter 10 μ L de tampon "Reagent mix" et bouillir le mélange pendant 2 minutes et ensuite placer immédiatement sur la glace.
5. Ajouter 1 μ L de l'enzyme polymérase T7 ADN et ensuite ajouter 5 μ L de ^{32}P - α -dCTP (25 mCi) de DuPont.
6. Incuber la réaction à 37°C pendant 15 minutes.

Récupération de l'ADN:

7. Ajouter 3 volumes de "Gel solubilizer", soit 150 μ L.
8. Ajouter 5 μ L de matrice et incuber 10 minutes à la température de la pièce.
9. Centrifuger pendant 5 minutes.
10. Transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf et le garder jusqu'à la fin de l'expérience.
11. Ajouter 250 μ L de "Wash Buffer" et resuspendre délicatement le culot à l'aide de la pipette.
12. Centrifuger pendant 4 minutes.
13. Jeter le surnageant (à l'endroit approprié car c'est radioactif).
14. Refaire deux fois les étapes 11 à 13.
15. Sécher le culot pendant 10 minutes.
16. Resuspendre délicatement le culot dans 250 μ L d'eau et incuber pendant 10 minutes à la température de la pièce (taper sur le tube à chaque minute).
17. Centrifuger pendant 5 minutes.
18. Transférer le surnageant dans un nouveau tube vissable.
19. Répéter les étapes 16 et 17.

20. Prélever 1 μ L du surnageant, mettez-le dans une fiole contenant du liquide à scintillation. Compter la quantité de radioactivité incorporée dans l'ADN.

N.B.: Pour avoir une bonne incorporation, il faut obtenir 1 million de CPM par mL de solution.

21. Bouillir la sonde pendant 2 minutes avant de la déposer dans 7 mL de liquide d'hybridation (préalablement chauffé à la température d'hybridation).

SÉQUENÇAGE

Magic Mini:

Matériel:

mini colonne avec filtre de Promega

Solution:

1. Sln I: Même que pour mini préparation de plasmides.
2. Sln II: Même que pour mini préparation de plasmides.
3. Sln III: Même que pour mini préparation de plasmides.
4. Sln de rinçage (Wash Buffer): 200 mM de NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5;
5 mM EDTA le tout dilué 1:1 avec éthanol
95 %.

Protocole:

1. Faire une deuxième transformation de trois clones positifs sélectionnés par les minis.
2. Mettre en culture une colonie isolée dans 5 mL de milieu et faire croître toute la nuit à 37°C.

Compléter le volume à 1 L

Protocole:

Préparation des réactions de séquences:

1. Mettre dans un même tube, 18 μL de magic mini et 2 μL d'amorce 20 mM.
2. Ajouter 4 μL d'une solution NaOH 2N+EDTA 2mM.
3. Mettre un capuchon sur le microtube et le faire chauffer 2 minutes à 85°C.
4. Ajouter séquentiellement:
 - 14 μL D'H₂O
 - 6 μL NaOAC 3M pH 5.2
 - 120 μL d'Éthanol 100 %
5. Mettre 10 minutes à -70°C.
6. Centrifuger 15 minutes à 4°C.
7. Faire sécher le culot dans le lyophilisateur environ 5 minutes. **Ne pas trop sécher** sinon le culot devient difficile à dissoudre.
8. Dissoudre le culot dans 12 μL d'H₂O.
9. Ajouter 2 μL "Annealing Buffer" et incuber 20 minutes à 37°C et laisser refroidir à température de la pièce.
10. Ajouter 2,5 μL de dATP, dCTP, dGTP et dTTP dans les tubes appropriés.
11. Faire un mélange (toujours garder sur glace):
 - 1 n μL d'H₂O
 - 3 n μL "Labeling Mix" A (si l'isotope marqué est le A) ou C (si l'isotope marqué est le C)
 - x μL Polymérase T₇ de Pharmacia (1,5 U)
 - y μL de Tampon de dilution (2 n μL T₇ + tampon)

N.B.: n correspond au nombre de réaction.

-
12. Ajouter n μL de ³⁵S- α -dATP (DuPont) dans le mélange contenant l'enzyme.
 13. Incuber les tubes contenant les dNTP au moins 2 minutes à 37°C.
 14. Ajouter 6 μL de "premix" dans les tubes d'annealing refroidis et laisser incuber 5 minutes.

15. Ajouter 4,5 μ L de la solution d'annealing/premix à chaque tube contenant les dNTP à 37°C. Prendre soin de **changer d'embout à chaque tube**. Laisser incuber 5 minutes.
16. Ajouter 5 μ L de solution "Stop".

Préparation du gel:

17. Préparer le gel de polyacrylamide:
 - 35 mL d'H₂O
 - 10 mL de TBE 10X
 - 15 mL de Bis-Acrylamide 40%
18. Laisser dissoudre complètement.
19. Laver les vitres (une grande et une petite) avec du savon et les mettre sur du papier, rincer avec une séquence H₂O/Éthanol/Sigmacote de Sigma (silicone est pour la petite vitre seulement). Monter les vitres avec des espaceurs prévus à cette fin de façon à ce que tout soit égal. Mettre du ruban spécialement conçu.
20. Laver les peignes.
21. Ajouter 20 μ L de Temed (Bio-Rad) et 1 mL d'ammonium persulfate (APS) 10 % (Gibco).
22. Couler le gel en laissant un mince filet continu.
23. Mettre les peignes à l'envers en ajustant avec un scalpel dans les espaces sur les peignes pour faire un ligne droite.
24. Laisser polymériser 1 heure.

Migration du gel:

25. Enlever le ruban en bas pour laisser passer le courant.
26. Monter les plaques sur l'appareil de migration, fermer le robinet qui laisse écouler le tampon de la cuve du haut et ajouter du tampon de migration (TBE 1X) dans les cuves. Enlever l'urée qui sort du gel avec une seringue. Laisser équilibrer au moins 20 minutes et organiser l'appareil à séquençage avec les paramètres suivants:

-Puissance constante:	60 W
-Limites:	2 500 Volts

10 mA

95 W

27. Mettre les échantillons au moins 2 minutes à 85°C et enlever à nouveau le surplus d'urée.
28. Mettre les peignes badigeonner de graisse de façon à former des puits et charger 2,5-5 µL d'échantillon par puit. Le gel est généralement chargé dans l'ordre A, C, G et T.
29. Laisser migrer le temps désiré.

Démouler le gel:

30. Laisser couler le tampon de la cuve du haut et enlever le montage vitres/gel.
31. Enlever le ruban, les espaceurs et la petite vitre en prenant soin de ne pas déchirer le gel d'environ 0,4 mm.
32. Mettre la grande vitre sur laquelle repose le gel dans le bac et verser doucement le mélange 10% acide acétique et 10% méthanol. Laisser 20 minutes et retirer le liquide.
33. Mettre un papier 3M sur le gel et tourner le tout de façon à obtenir la grande vitre sur le dessus. Enlever celle-ci et ajouter une pellicule de plastique (saran-wrap) directement sur le gel et le faire sécher 1-3 heures.
34. Exposer le gel avec un film pour toute la nuit.

CULTURE CELLULAIRE

PRÉPARATION DE MILIEU

Décomplémentation du sérum:

1. Faire décongeler le sérum à 4°C toute la nuit ou dans un bain-marie à 56°C.
2. Incuber le sérum à 56°C pour 1 heure en agitant de temps en temps (la norme est d'au moins 30 minutes).
3. Aliquoter 10 mL dans des tubes de 15 mL stériles.

Préparation du sérum désactivé au charbon:

1. Décomplémenter le sérum.
 2. Peser 24 g de Norit-A charbon en poudre et le laver dans 800 mL d'H₂O distillé et laisser agiter 15 minutes.
 3. Mettre dans des bouteilles à centrifugation (Nalgene) de 250 mL et centrifuger à 4°C 15 minutes à 9 000 RPM (rotor JA-14 Beckman).
 4. Jeter le surnageant et resuspendre dans un autre 800 mL d'H₂O distillé.
 5. Laisser agiter 15 minutes.
 6. Centrifuger à 4°C 15 minutes à 9 000 RPM (rotor JA-14 Beckman) et jeter le surnageant.
 7. Récupérer le charbon avec 20 mL de sérum décomplémenté et passer d'une bouteille à l'autre pour récupérer le charbon. Rincer les bouteilles avec un autre 20 mL pour récupérer le charbon entièrement (ne pas dépasser 60 mL).
 8. Séparer le mélange sérum/charbon en partie égale (utiliser une balance). Garder une partie et garder l'autre à 4°C pour le lendemain.
 9. Peser 0,12 g de dextran T-70 et dissoudre dans 4 mL d'H₂O distillé.
 10. Mélanger le reste du sérum décomplémenté avec une partie du charbon et le dextran.
 11. Laisser agiter toute la nuit à 4°C.
 12. Centrifuger à 4°C pour 15 minutes à 9 000 RPM (rotor JA-14 Beckman; dans des bouteilles de 250 mL).
 13. Garder le sérum (surnageant et jeter le charbon).
 14. Préparer 0,12 g de dextran dans 4 mL d'H₂O distillé.
 15. Mélanger le sérum avec l'autre demi du charbon et le dextran.
 16. Agiter 1 heure à température de la pièce.
 17. Centrifuger à 10 000 RPM (rotor JA-14 Beckman) pour 30 minutes.
 18. Récupérer le sérum et centrifuger à nouveau à 10 000 RPM (rotor JA-14 Beckman) pour 1 heure (dans des nouvelles bouteilles).
 19. Récupérer le sérum et filtrer avec MilliPak 40 (Millipore).
-

RPMI 1640:

1. Ajouter 800 mL d'H₂O distillé dans un bécher de 1 litre.
2. Ajouter le contenu d'un sachet RPMI 1640 (Gibco/BRL) et laisser dissoudre complètement.
3. Ajouter 2 g de NaHCO₃ (bicarbonate) et laisser dissoudre.
4. Ajuster le pH à 7,1-7,2.
5. Compléter le volume à l'aide d'un ballon volumétrique (gaugé) et filtrer avec un filtre 0,22 µm (spécialement conçu pour les bouteilles).
6. Pour 100 mL de milieu complet, ajouter:
 - 89 mL de milieu RPMI 1640 stérile
 - 1 mL de Antibiotique-Antimicotique 100X (Gibco/BRL) contenant: 10 000 U/mL de penicilline, 10 000 µg/mL de streptomycine et 25 µg/mL d'amphotérine.
 - 1mL de Sérum de veau nouveau-né (NCS) de chez ICN et décomplémenté.
 - 1mL de Glutamine 200 mM

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM):

1. Procéder de la même façon que pour le milieu RPMI 1640 à l'exception du NaHCO₃ ajouter 3,7 g au lieu de 2 g.

L-Glutamine (200 mM):

1. Peser 0,2922 g de glutamine (Sigma) lyophilisé de poids moléculaire 146,1 g/Mole dans un tube de 15 mL.
2. Compléter le volume à 10 mL avec de l'eau.
3. Filtrer la solution avec un filtre à seringue de 0,22 µm dans un nouveau tube stérile.

Généticine:

1. Peser la poudre de G-418 sulfate (Gibco/BRL) pour obtenir une concentration de 10 mg/mL.
2. Compléter avec de l'eau distillé stérile au volume désiré.
3. Filter la solution avec un filtre à seringue de 0,22 mm dans un nouveau tube stérile.

ISOLATION DE CELLULES ENDOMÉTRIALES PROVENANT DE CORNES UTÉRINES

Protocole:

1. Préparer 500 mL de milieu Hank's (Gibco) en incluant antibiotique-antimycotique 100X (1mL/100 mL de milieu). Séparer en 2 aliquots de 250 mL dans des béchers de 500 mL.
2. Préparer un plastique stérile, deux paires de pinces stériles, deux paires de ciseaux (une petite et une plus grosse), un pétri stérile et des gants stériles.
3. Préparer 0,24 g de trypsine (Sigma) pour 2 cornes, le sérum décomplémenté et 2 tubes de Hank's (par corne).
4. Récupérer la corne correspondant à l'ovaire ayant un *corpus hemoragicum* et mettre la corne dans un premier bécher avec Hank's+Antibiotique et répéter avec une deuxième corne (si nécessaire).
5. Couper le surplus de tissus pour éviter d'entraîner trop de globules rouges et mettre la corne dans l'autre bécher contenant la solution de Hank's et reprendre avec la seconde corne.
6. Ajouter 20 mL de Hank's au 0,24 g de trypsine et démêler avec une seringue.
7. Filtrer la solution de trypsine en incluant 5 mL de trypsine par tube de digestion (4 tubes en tout, lorsque l'on utilise 2 cornes).
8. Ajouter 15 mL de Hank's à chaque tube de digestion. Chaque tube devrait donc contenir 20 mL de milieu.
9. Tourner les cornes de façon à avoir l'intérieur de la corne vers l'extérieur et fermer les deux extrémités ainsi que deux fois dans le milieu de la corne avec du fil à suture Ethicon 2,0 (Ethicon).

10. Couper dans le milieu de la corne, entre les deux points de suture.
11. Mettre 1/2 corne par tube de digestion et incuber 2 heures en inversant à chaque 1/2 heure.
12. Ajouter 20 mL de Hank's dans des tubes servant au rinçage.
13. Une fois la digestion terminée, retirer les cornes des tubes de digestion et les mettre dans les tubes de rinçage.
14. Ajouter 5 mL de sérum décomplémenté dans les tubes contenant la solution de trypsine pour arrêter l'action de la trypsine.
15. Bien brasser les tubes de rinçage et retirer les 1/2 cornes.
16. Mélanger la solution de trypsine avec la solution de rinçage et centrifuger à 1 000 RPM (rotor GH 3,8 Beckman) pour 10 minutes à température de la pièce.
17. Ajouter 10 mL de milieu Hank's dans chaque tube et rassembler la suspension cellulaire dans un même tube.
18. Rincer les tubes vides avec 10 mL de Hank's et mettre avec l'autre 20 mL. Le volume final est donc de 30 mL.
19. Centrifuger à 1 000 RPM (rotor GH 3,8 Beckman) pour 10 minutes à température de la pièce.
20. Laver les cellules avec 25 mL de Hank's et centrifuger à 1 000 RPM (rotor GH 3,8 Beckman) pour 10 minutes à température de la pièce.
21. Resuspendre dans le milieu désiré.

COMPTE DE CELLULES

1. Ajouter 80 μ L de suspension cellulaire dans un microtube de 1,5 mL.
2. Ajouter 20 μ L de Trypan bleu 0,4 % diluer dans de la saline 0,9%.
3. Installer l'hémacytomètre sur le microscope avec une lamelle. Ajouter le mélange suspension/trypan bleu de façon à combler l'espace entre l'hémacytomètre et la lamelle.
4. Compter les cellules vivantes (transparentes) et les cellules mortes (bleues) dans les chambres indiqués sur la figure 14. Faire le même décompte des 2 côtés de l'hémacytomètre.

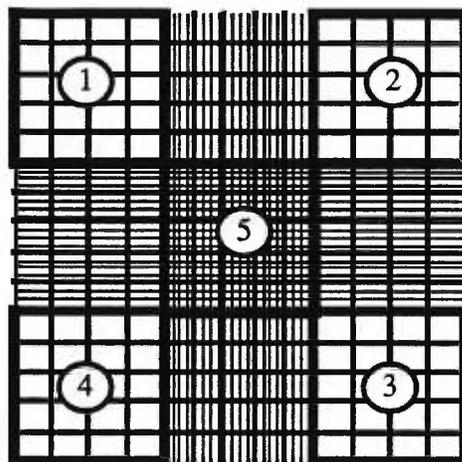


Figure 14: Schéma représentant les chambres à compter sur l'hémacytomètre.

5. Faire le compte de cellules selon les formules suivantes:

Compte des cellules/mL:

$$\frac{\text{\# de cellules vivantes}}{10 \text{ chambres}} \times \text{inverse de la dilution (dilution } 80/100) \times 10^4 = \text{\# cellules/mL}$$

Compte du % de viabilité:

$$\frac{\text{\# de cellules vivantes}}{\text{\# cellules totales (vivantes+mortes)}} \times 100 = \% \text{ viabilité}$$

6. Ajouter la quantité de cellules désirées dans les puits.

PRÉPARATION DU MATÉRIEL POUR LA CULTURE CELLULAIRE

Matrigel:

Toujours utiliser du matériel à 4°C et garder le matrigel sur glace.

1. Aliquoter le matrigel (Collaborative Biomedical Products) en 1 mL dans un tube de 15 mL. Garder à -20°C jusqu'à l'utilisation.
2. Au moment d'utiliser le matrigel, dégeler à 4°C et dilué 1:8 avec de l'eau.
3. Mettre 300 µL au fond des puits de la plaque contenant 6 puits et laisser sécher.

ISOLATION DES CELLULES EN CULTURE

En culture sur un tapis de matrigel:

1. Préparer une solution stock de dispase (Gibco/BRL):
10 mg de dispase lyophilisé/mL de PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ (Gibco).
2. Diluer la solution stock pour obtenir une concentration finale de 0,6 à 2,4 U/mL.
3. Retirer le milieu de culture et le garder dans un tube de 50 mL.
4. Couvrir les cellules avec la solution de dispase diluée préchauffée à 37°C et incubé à 37°C pour 5 minutes.
5. Retirer la suspension de cellules et incubé à nouveau pour 10 minutes.
6. Centrifuger les cellules à 4°C pour 5 minutes à 2 000 RPM (rotor GH 3,8 Beckman).
7. Laver les cellules avec du milieu sans sérum ou PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺.
8. Resuspendre le culot dans une quantité suffisante de milieu complet et mettre en culture.

La culture dans un flask:

1. Préparer la trypsine (Sigma) 10 X comme suit:
-Peser environ 75 000 U d'enzyme

-Ajouter 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0

-Compléter à 10 mL avec du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++}

2. Filtrer la solution de 10 X.
3. Aliquoter en 1 mL dans des tubes de 15 mL.
4. Ajouter 9 mL de PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} .
5. Garder à -20°C jusqu'à l'utilisation.
6. Enlever le milieu de culture et le garder dans un tube de 50 mL.
7. Ajouter 5 mL de trypsine 1X par gros flask de culture.
8. Laisser les cellules se détacher et récupérer la trypsine et les cellules et mettre le tout dans le tube de 50 mL contenant le milieu et rincer le flask à culture avec du PBS ou du milieu sans sérum.
9. Centrifuger 10 minutes à 1 500 RPM (rotor GH 3,8 Beckman).
10. Laver les cellules avec du PBS ou du milieu sans sérum.
11. Centrifuger à nouveau (idem que l'étape 9).
12. Resuspendre dans une quantité suffisante de milieu complet et remettre en culture, congeler ou autre.

CONGÉLATION ET DÉCONGÉLATION DE CELLULES

Congélation:

1. Préparer un bac rempli de glace et faire des trous pour les tubes de cryopréservation et mettre le tout à -70°C .
2. Suivre le protocole de trypsinisation ou de récupération avec la dispase pour recueillir les cellules.
3. Mettre 80 μL de diméthyl sulfoxyde (DMSO) (J.T. Baker) dans des tubes de cryopréservation déjà sur la glace à -70°C .
4. Ajouter 920 μL de suspension cellulaire, bien mélanger avec la pipette et remettre sur la glace à -70°C .
5. Garder au congélateur -70°C toute la nuit et transférer dans l'azote liquide pour entreposer.

Décongélation:

1. Sortir les tubes de cryopréservation à décongeler et les mettre sur glace.
 2. Lorsque la majeure partie est dégelée, transférer le contenu du tube dans un tube 15 mL contenant du milieu sans sérum (permet de diluer DMSO qui est toxique pour les cellules).
 3. Centrifuger à 4°C pour 5 minutes à 2 000 RPM (rotor GH 3,8 Beckman).
 4. Laver les cellules avec du milieu sans sérum.
 5. Resuspendre dans une quantité suffisante de milieu complet et mettre les cellules en culture.
-