



HAL
open science

CARACTERISATION DE LA 12-S-LIPOXYGENASE DANS L'ENDOMETRE OVIN PENDANT LA GESTATION PRECOCE MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE DE DEUX TRANSCRITS

Olivier O. Dubois

► **To cite this version:**

Olivier O. Dubois. CARACTERISATION DE LA 12-S-LIPOXYGENASE DANS L'ENDOMETRE OVIN PENDANT LA GESTATION PRECOCE MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE DE DEUX TRANSCRITS . Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01430367

HAL Id: hal-01430367

<https://ephe.hal.science/hal-01430367v1>

Submitted on 9 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE présenté par

Olivier DUBOIS

Pour l'obtention du Diplôme SVT de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

***CARACTERISATION DE LA 12-S-LIPOXYGENASE DANS L'ENDOMETRE OVIN
PENDANT LA GESTATION PRECOCE
MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE DE DEUX TRANSCRITS***

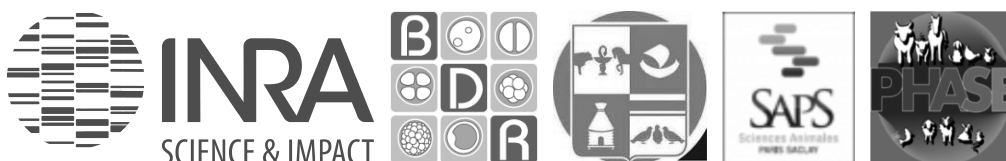
Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Gilles CHARPIGNY

INRA - Centre de Recherche de Jouy-en-Josas (78350)
UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction
Environnement Maternel et Développement Péri-Implantatoire
Directrice : Corinne COTINOT

Dr Flore RENAUD-PAITRA

EA 4589 - Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire (LGBC)
UFR des sciences de la santé Simone Veil - 78180 Montigny-le Bretonneux
Directeur : Bernard MIGNOTTE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la vie et de la terre

MEMOIRE présenté par

Olivier DUBOIS

Pour l'obtention du Diplôme SVT de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

***CARACTERISATION DE LA 12-S-LIPOXYGENASE DANS L'ENDOMETRE OVIN
PENDANT LA GESTATION PRECOCE
MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE DE DEUX TRANSCRITS***

**Soutenu le Mercredi 14 décembre 2016, à 14h00, Amphithéâtre Bâtiment 440
Jacques Poly, INRA, Centre de recherche de Jouy-en-Josas (78350), France**

Devant le jury suivant :

Mme Sylvie DEMIGNOT, DE EPHE, Doyenne Section SVT EPHE – Président

Mr Gilles CHARPIGNY, CR1 INRA – Tuteur scientifique

Mme Flore RENAUD-PAÏTRA, MC – EC EPHE UVSQ – Tuteur pédagogique

Mme Catherine CHAUMONTET, IR1 INRA/AgroParitech – Rapporteur

Mr Bertrand BLONDEAU, MCU INSERM – UPMC Paris VI – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Gilles CHARPIGNY

INRA – Centre de Recherche de Jouy-en-Josas (78350)
UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction
Environnement Maternel et Développement Péri-Implantatoire
Directrice : Corinne COTINOT

Dr Flore RENAUD-PAÏTRA

EA 4589 – Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire (LGBC)
UFR des sciences de la santé Simone Weil – 78180 Montigny-le Bretonneux
Directeur : Bernard MIGNOTTE

Merci, Merci, Merci...

Alors, nous y voilà... au bout de ces quatre années d'apprentissage. Un parcours expérimental pas toujours facile, parfois même compliqué. Mais je suis arrivé au bout, à l'objectif que je m'étais fixé et c'est là le plus important. Parfois démoralisé, mais si souvent enthousiaste et confiant.

Après 20 années d'expérience en recherche, j'ai repris ce cursus pour obtenir un diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes. Sacré challenge!!! Facile d'encadrer des étudiants pendant ces années, de leur inculquer les bases expérimentales, un sens pratique et une organisation. Facile d'avoir une vue d'ensemble sur leurs résultats expérimentaux, un sens critique sur leur rédaction et de les guider dans ces divers parcours. Affiner ma pédagogie au fur et à mesure du temps était évident. En revanche, lorsqu'il s'agit de soi...hum... se retrouver à leur place et tenter d'avoir ce regard sur soi-même, là, c'est une autre affaire!!!

Malgré tout, je suis arrivé au bout. J'ai tellement appris de choses pendant ces 1460 jours!!! D'abord, bien entendu, d'un point de vue expérimental. Nouvelles approches technologiques mais aussi nouvelle vision du métier au contact de collègues qui m'ont fait grandir professionnellement.

Je les en remercie tous ici, à commencer par mes deux Co-responsables d'équipe, Gilles Charpigny et Olivier Sandra. Au bout de 13 années, ils se sont probablement aperçus qu'une routine professionnelle s'installait et que ça ne pouvait pas être compatible avec ma personnalité, mon caractère. Gilles m'a donc proposé ce projet d'études. Ouah, un projet, rien que pour moi...angoissant au départ mais tellement stimulant intellectuellement. Je lui ai demandé un jour de réflexion... et banco, le lendemain, j'étais prêt psychologiquement à relever le défi. Olivier S., quant à lui, a acquiescé et m'y a encouragé. Merci à vous deux pour cela. Merci aussi à Olivier pour ses conseils, ses relectures (en particulier celles concernant le poster pour le congrès ICAR du mois de juin de cette année), des conversations nombreuses que nous avons eues, cette année aussi. Je crois que nous n'avons jamais autant parlé ensemble professionnellement qu'en 2016!!! Et toi, Gilles, mon tuteur scientifique EPHE, qui a été le premier à me proposer ce projet. Nous travaillons ensemble dans le même groupe de recherche depuis 17 ans. Cette dernière année a été la plus éprouvante pour moi, la plus dure, consacrée à la rédaction de ma « mini thèse », comme je l'appelle. Tu m'as laissé une totale autonomie, gérer mes expérimentations et mon temps... Merci pour ta confiance. Ce fut vraiment formateur et, après coup, on se retrouve heureux d'avoir surmonté toutes les difficultés. J'ai appris beaucoup à tes côtés pendant ces 17 années et cela m'a bien servi pour ce cursus EPHE. Au-delà des discussions scientifiques, nous avons partagé nos connaissances concernant des domaines très divers. Nous avons monté ensemble l'activité Biologie moléculaire au sein du labo, inexistante avant mon arrivée. Tu m'as donné les fondamentaux du "bricolage" au labo, toi le roi du travail du bois. "Bricolage" est peut-être un bien grand mot, me concernant, mais j'ai acquis à tes côtés un sens pratique face aux petits tracas

de pannes diverses qui peuvent se présenter au quotidien, au laboratoire comme dans la vie privée.

Au sein de mon équipe d'appartenance, ER2 ou "Environnement Maternel et Développement péri-Implantatoire", je souhaite ici remercier l'ensemble de mes collègues pour leurs encouragements, en particulier à Philippe Bolifraud, Corinne Giraud-delville, Laurent Galio, Mariam Raliou, Isabelle Hue, et notre petite étudiante en thèse Audrey Lesage. Merci à vous d'avoir patienté pendant ce temps de formation. Je reviens désormais parmi vous. Attention, j'arrive!!! Je profite de l'occasion pour dire merci à notre ancienne thésarde, Caroline Eozéno, désormais en post-doctorat à l'institut Pasteur (Paris). Toujours restés en contact, elle m'a encouragé dans les moments de doute (c'est le monde à l'envers... moi qui suis en poste!!! Ce devrait être l'inverse). Merci donc, Caroline, de la part de ton "n'amoureux" comme tu aimes m'appeler pour plaisanter.

Un grand merci, tout particulier, à Pierrette REINAUD, ingénieur de son état au sein de notre équipe, cultivatrice de cellules et reine du Western blot sans bruit de fond!!! Mamie REINAUD, pour beaucoup d'étudiants, personne référente pour bon nombre d'activités de biologie cellulaire et si maternelle avec beaucoup d'entre nous. Merci à toi de m'avoir plus qu'aidé dans ce projet, en particulier pour les transfections et les mesures d'activité enzymatique des protéines recombinantes. Merci pour ton écoute, ta présence, tes conseils. 17 ans que nous travaillons ensemble au sein de la même équipe. Tu en as vu des générations d'étudiants passer... Et voilà que je m'y suis ajouté. Mes premières expérimentations au sein de l'équipe en 1999 ont été faites à tes côtés pendant quelques mois avec des analyses par Western blot. Tu m'as appris l'exigence nécessaire à l'obtention d'images soignées et exploitables. Voilà que pour ce projet EPHE, je reviens en partie vers cette technologie. J'ai retrouvé mes réflexes!!!

Je remercie ici aussi Geneviève Jolivet, qui m'a encadré techniquement pendant une année au sein de l'équipe ER3 "Différenciation gonadique et ses perturbations". J'ai appris à tes côtés tellement de choses !!! Tu représentes pour moi l'équivalent au féminin de Gilles... Ton sens pratique m'a tant aidé. J'ai appris avec toi à lire une carte de plasmide, chose qui me paraissait jusqu'alors aussi difficile que déchiffrer un cartouche royal sur la pierre de rosette à la manière de Champollion. Tu m'as inculqué les bases de conception des vecteurs d'expression en système procaryote comme eucaryote. Ton sens du terrain, ta gentillesse et ton enthousiasme ont été pour moi vraiment précieux. Merci pour ces moments passés avec toi au sein de l'équipe dynamique d'Eric Pailhoux, Béatrice Mandon-Pépin, Dominique Thépot, Maëlle Pannetier, Elodie Poumerol-Lesueur, Marjolaine André, Nathalie Daniel-Carlier, Erwana Harsoët et des étudiantes du moment. Merci à Barbara Panneau, "Barbie" comme j'aime à l'appeler, cousine lointaine des Antilles, désormais en post-doctorat à l'Institut Gustave Roussy de Villejuif. Que de bons souvenirs gardés en mémoire grâce à vous tous et votre bonne humeur.

Mes remerciements s'adressent également à Corinne COTINOT, Directrice de l'Unité INRA BDR ("Biologie du Développement et reproduction"). Merci Corinne d'avoir accepté que je suive ce cursus et de m'avoir conseillé de réaliser toute ou partie des expérimentations en dehors de mon équipe d'appartenance, voir

ce qui se fait ailleurs. Cela m'a fait un bien fou!!! Il faut savoir partir pour mieux revenir, fort d'un enrichissement qui devrait renforcer les compétences de l'équipe. J'ai d'ailleurs pu mettre à profit depuis les acquis concernant la conception de vecteurs d'expression pour un autre projet de mon équipe ER2 qui a abouti à l'obtention de protéines recombinantes particulières avec ou sans retrait de certains domaines. On bat le fer tant qu'il est chaud et on met en application rapidement !!!

Merci à tous les membres de l'unité BDR, à certains collègues de l'unité GABI, Sandrine Floriot et Barbara Petridou, en particulier. Merci à vous tous avec qui je suis en contact depuis quelques années. Nos échanges, vos conseils parfois, nos discussions autour d'un café parfois ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Merci à l'équipe administrative qui m'a aidé à régler de petits problèmes mais sans laquelle ces problèmes auraient pu être plus importants. Enfin, merci à Mélanie JOUIN, ancienne Diplômée de l'EPHE (pas si ancienne!!!) pour ses conseils en début de cursus, pour l'inscription à l'EPHE et tout au long de ce parcours.

Je profite de ce moment pour remercier ma tutrice pédagogique EPHE, Flore RENAUD-PAITRA. Merci Flore pour vos précieux conseils, pour m'avoir permis de suivre l'Unité d'Enseignement dont vous êtes responsable ("Génétique et Biologie Moléculaire"). Je garde un bon souvenir de mon passage en fin de première année dans votre unité de recherche à l'UVSQ pour vous exposer mes premiers travaux. Merci pour vos relectures de manuscrit, vos questions et vos remarques.

Je saisi aussi l'occasion, ici, pour remercier l'ensemble des membres du jury de soutenance devant lesquels je vais exposer ce projet d'étude le 14 décembre prochain, à 14h00. Une petite appréhension, normale, a priori, de finaliser ce cursus devant vous mais satisfait d'arriver là. En plus de Flore Renaud-Paitra et Gilles Charpigny, mes tuteurs, merci à :

* Sylvie Demignot, Présidente de ce jury et Directrice d'études EPHE à INSERM UMR S 1138 LPCM (Equipe PINFB), au centre de Recherches des Cordeliers à Paris. Merci d'avoir accepté de présider cette instance. J'ai suivi trois Unités d'enseignement avec vous (UE " Communication écrite, orale et documentation", UE Socle "Biologie cellulaire et moléculaire", UE " Biologie cellulaire"). J'ai apprécié votre pédagogie.

* Catherine Chaumontet, Rapporteur de mon manuscrit et Ingénieur de Recherche INRA, AGROPARITECH. Merci Catherine pour cet engagement. Un "livre de chevet" pour lequel la gestation a mérité quelques mois. J'espère que la lecture en sera agréable!!!

* Bertrand Blondeau, Examineur et Maître de Conférence Universitaire UPMC Paris VI, INSERM UMR-S 872 (équipe PCCD), au centre de Recherches des Cordeliers à Paris. Merci d'avoir accepté de siéger au sein de ce jury et de lire "ma prose". Merci aussi pour la qualité du cours auquel j'ai assisté à l'UE "Stratégie en Biologie cellulaire".

Enfin, je remercie Guillaume, ma famille, mes amis pour leurs encouragements. Merci à vous d'avoir été là pendant ce parcours. Merci pour votre soutien, cela m'a toujours aidé. J'espère n'avoir oublié personne...

Nomenclatures utilisées

* Nomenclature adoptée "Gène / transcrit / Protéine" dans ce mémoire

La convention d'écriture adoptée pour les ruminants et l'humain est la suivante :

Gène *ALOX12* (caractères en majuscules, italique)

Transcrit et ADNc *ALOX12* (caractères en majuscules, italique)

Protéine *ALOX12* (ou **12-LO** ou **12LOX** ou **12-Lox**, ou **12-lipoxygénase**)
(Caractères en majuscules)

La convention d'écriture adoptée pour les espèces murines (souris, rat) est la suivante :

Gène *Alox15b* (1ère lettre en majuscule et caractères en minuscules, italique)

Transcrit et ADNc *Alox15b* (1ère lettre en majuscule et caractères en minuscules, italique)

Protéine *ALOX15B* (ou **ALOX8**) (ou **8LOX** ou **8-Lox**, ou **8-Lipoxygénase**)
(Caractères en majuscules)

AA = Acide Arachidonique

a.a. = acides aminés

LOX = Lipoxygénase

* Nomenclature adoptée au laboratoire pour les formes de la 12-lipoxygénase :

Forme "normale" ou "longue" => Transcrit *In10*, Protéine LN10

Forme "courte" (variant d'épissage) => Transcrit *I4*, Protéine L4

* Nomenclature pour les amorces oligonucléotidiques :

F/R = Forward/Reverse (ou S/AS pour Sens/Antisens)

* Métabolites issus de l'activité des cyclooxygénases 1 & 2

6 kéto-PGF_{1α} = 6-kéto Prostaglandine F1 alpha

PGF_{2α} = Prostaglandine F2 alpha

PGE₂ = Prostaglandine E2

dhk-PGF_{2α} = 13,14-dihydro-15-kéto-Prostaglandine F2 alpha

PGD₂ = Prostaglandine D2

dhk-PGE₂ = 13,14-dihydro-15-kéto PGE₂

TxB₂ = Thromboxane B2

HHT = Acide Hydroxy-Heptadécatriénoïque

* Métabolites issus de l'activité des Lipoxygénases 5, 11, 12 ou 15

LT = Leucotriènes issus de la voie de la 5-Lipoxygénase (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄)

HETE = acide Hydroxy-éicosatétraénoïques issus de l'activité des 4 principales lipoxygénases respectives (5-HETE, 11-HETE, 12-HETE et 15-HETE)

Liste des abréviations - Définitions

ADNc = ADN complémentaire

Agnelle = jeune brebis femelle de moins d'un an

ARNm = ARN messager, transcrit polyadénylé

BET = Bromure d'Ethidium

Blastocyste = Terme désignant l'un des premiers stades du développement embryonnaire. Il est commun à tous les mammifères. Le blastocyste se situe entre le 5ème et le 7ème jour chez l'homme, 7ème au 8ème jour chez les ruminants. Il s'agit d'un stade au cours duquel coexistent les cellules périphériques, appelées "cellules du trophoctoderme" (ou trophoblaste), à l'origine des structures extra-embryonnaires (placenta, cordon ombilical...), et des "cellules de la masse interne", qui forment le bouton embryonnaire et donnent naissance à l'embryon proprement dit ainsi qu'à quelques annexes embryonnaires. Entre la masse cellulaire interne et le trophoctoderme se forme une cavité appelée "Blastocèle".

Bq = *Becquerel* - Unité dérivée du Système international d'unités (SI) pour l'activité d'une certaine quantité de matière radioactive, c'est-à-dire le nombre de désintégrations qui s'y produisent par seconde. Remarque : $1 \mu\text{Ci} = 3,7 \cdot 10^4 \text{ Bq}$

BSA = *Bovine Serum Albumin* (Albumine Sérique Bovine)

Conceptus = Embryon et ses annexes ou ses membranes associées. Le conceptus inclut toutes les structures développées à partir du zygote (œuf), à la fois embryonnaires et extra-embryonnaires. Il inclut l'embryon, ainsi que la partie embryonnaire du placenta et ses membranes associées (amnios, chorion, sac vitellin).

Contig = séquence génomique continue et ordonnée générée par l'assemblage des clones d'une bibliothèque génomique qui se chevauchent.

CTRL = contrôle

Cyclooxygénés = Nom générique regroupant l'ensemble des métabolites issus de la voie enzymatique des cyclooxygénases. Ces molécules sont dérivées d'un acide gras essentiel, l'acide arachidonique, acide gras insaturé à 20 atomes de C avec un seul anneau cyclopentane (éicosanoïdes cycliques), présent notamment dans les membranes cellulaires. Sous le nom "cyclooxygénés" sont rassemblés les prostanoïdes (ou prostaglandines), Thromboxanes (A2, B2) et HHT (Acides Hydroxy-Heptadécatriénoïde).

DAPI = 4', 6-Diamidino-2-Phénylindole, molécule fluorescente capable de se lier fortement à certaines bases azotées de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), l'Adénine et la Thymine

DMEM-F12 = *Dulbecco's Modified Eagle Medium / nutrient mixture F-12*, Milieu de culture utilisé couramment *in vitro* pour la culture de cellules de mammifères (Composition selon la formule *SIGMA ALDRICH*, Ref. produit *D6434*).

DNase = Désoxyribonucléase

dNTPs = DiNucléotides TriPhosphates

DTT = Dithiothréitol, petite molécule, usuelle pour les études de biochimie, à pouvoir réducteur, utilisée pour réduire les ponts disulfures des protéines, empêchant ainsi l'oxydation des cystéines

Eicosanoïdes = Ensemble de molécules constituant une vaste famille de dérivés d'oxydation d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone comme l'acide arachidonique (C₂₀:₄ (ω-6)). Ils peuvent être cycliques ou linéaires (leucotriènes). On distingue deux types d'eicosanoïdes : les Leucotriènes et les prostanoïdes (parmi ces derniers, on distingue les prostaglandines (PG), les Thromboxanes (TX) et la prostacycline (PGI)).

ER = Enzyme de Restriction

FAO = *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FITC = *Fluorescein IsoThioCyanate*, Isothiocyanate de Fluorescéine (dérivé de la fluorescéine utilisé comme fluorochrome)

FSH ou *Follicle Stimulating Hormone*, Hormone Folliculo-Stimulante. Secrétée par l'hypophyse, cette hormone peptidique, chez la femme et la femelle mammifère, stimule les cellules de la granulosa, entraîne la croissance des follicules ovariens et permet l'ovulation en fragilisant la paroi de l'ovaire.

GnRH = *Gonadotropin Releasing Hormone*, Hormone de libération des gonatrophines hypophysaires, de nature peptidique, elle est responsable de la synthèse de la FSH et de la LH (voir les définitions de ces termes).

Histotrophes = Terme désignant l'ensemble des nutriments fournis à l'embryon par les tissus utérins maternels. Ces facteurs nutritionnels sont à distinguer de ceux dérivés de la circulation sanguine maternelle (dits alors "hémotrophes").

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*, Chromatographie Liquide à Haute Performance

Ischémie = souffrance d'un organe ou d'un tissu consécutive à l'interruption de tout ou partie de la circulation artérielle à destination de cette zone anatomique

ITS = *Insulin / Transferrin / Selenium*, Insuline -Transferrine - Sélénium sodique, Facteurs de croissance utilisés dans la supplémentation des milieux de culture de cellules *in vitro*

KLH = *Keyhole limpet hemocyanin*, Hémocyanine de Patelle (type d'invertébré), agent de conjugaison d'un antigène permettant de faciliter le repérage rapide et d'induire la réaction immunitaire d'un organisme vis-à-vis de cet antigène, permettant ainsi la production d'anticorps spécifiques dirigés contre ce dernier.

KO = *Knock Out* ou "Invalidation génique", terme désignant l'inactivation totale d'un gène par recombinaison homologue

LH = *Luteinizing Hormone*, Hormone lutéinisante produite par l'hypophyse, cette glycoprotéine déclenche l'ovulation et est responsable de la maturation folliculaire et de la transformation du follicule ovarien en corps jaune pendant la phase lutéale du cycle œstral (ou menstruel).

Lipoxygénés = Nom générique regroupant l'ensemble des métabolites issus de la voie enzymatique des lipoxygénases. Ces molécules sont dérivées d'un acide gras essentiel, l'acide arachidonique, acide gras insaturé à 20 atomes de C avec un seul anneau cyclopentane (éicosanoïdes cycliques), présent notamment dans les membranes cellulaires.

Sous le nom "lipoxygénés" sont rassemblés les HETEs (Acides Hydroxyéicosatétraénoïques), les Lipoxines et les Leucotriènes.

MCS = Multi-Cloning Site, Site de multi-clonage d'un vecteur plasmidique

Mini, Midi et MaxiPrep = Préparations de plasmides - procédés d'extraction par lyse alcaline et de purification d'ADN sur colonnes pour l'ADN plasmidique issu de bactéries transformées. La minipréparation d'ADN est une technique d'isolement rapide, à petite échelle, d'ADN plasmidique à partir de bactéries. L'ADN de plasmide extrait résultant de l'exécution d'une minipréparation est lui-même souvent appelé "Miniprep". Les Minipreps sont utilisés dans le processus de clonage moléculaire pour analyser les clones bactériens. Un rendement d'ADN plasmidique typique d'une Miniprep est de 50 à 100 µg en fonction de la souche cellulaire. Pour la "Midiprep", le volume de culture de *E. coli* de départ est de 15-25 ml de bouillon de lysogénèse (LB) et le rendement d'ADN attendu est de 100 à 350 µg. Enfin, pour la "Maxiprep", le volume de culture de départ de *E. coli* est de 100-200 ml de LB et le rendement d'ADN attendu est de 500 à 850 µg.

NaOH = Hydroxyde de Sodium (Soude)

NBT-BCIP = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate / Nitro Blue Tetrazolium, substrat de la phosphatase alcaline (Hybridation *in situ*)

Orthologue = Deux gènes sont dits "orthologues" s'ils remplissent les deux conditions suivantes : Ils sont issus d'un ancêtre commun, ils ne sont pas le résultat d'une duplication génétique (par copie accidentelle d'un gène).

PAF = PAraFormaldéhyde

Pb = paire de bases

PBS (ou D-PBS) = (Dulbecco's) Phosphate Buffer Saline, Solution Tampon saline à base de Phosphate de sodium (KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ anhydre 0,2 g/l et NaCl 8 g/l) auquel peuvent être ajoutés des ions bivalents (CaCl₂ • 2 H₂O 0,133 g/l et MgCl₂ • 6 H₂O 0,1 g/l) donnant les versions D-PBS "avec ou sans Ca²⁺ et Mg²⁺".

PGR = Récepteur à la progestérone (*ProGesteron Receptor*)

Prostanoïdes = Terme désignant des éicosanoïdes synthétisés par la voie métabolique des cyclooxygénases (COX). Les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes en font partie. On les distingue selon l'acide gras dont ils dérivent : série 1 (acide gamma-linoléique), série 2 (acide arachidonique), série 3 (acide éicosapentaénoïque).

PVDF = Le Poly(Fluorure de VinyliDène) est un polymère du fluorure de vinyliDène. On l'utilise en biotechnologie comme membrane (à l'instar de la nitrocellulose plus commune) pour transférer des protéines que l'on a préalablement séparées par électrophorèse dans une technique appelée le western blot O

RACE = "Rapid Amplification of cDNAs Ends", Technique d'amplification rapide à partir des extrémités 5' et 3' d'un ADN

RNAse = Ribonucléase

RPM = Rotation Par Minute (ou Tours/minute)

SDS = Sodium Dodecyl Sulfate, ou Dodécylsulfate de Sodium, Détergent et tensioactif ionique fort, couramment utilisé en biochimie et biologie moléculaire

SNB = Sérum Normal de Brebis

SOC Medium = Super optimal broth with catabolite repression, Milieu de croissance pour bactéries. Le SOC est un bouillon liquide riche en éléments nutritifs qui contient des peptides, des vitamines hydrosolubles et du glucose. Le milieu est souvent utilisé dans l'étape de récupération des transformations cellulaires compétentes, en particulier pour les bactéries *E. coli*.

SSC = Saline-Sodium Citrate (SSC) buffer, Solution Tampon saline à base de citrate de sodium, utilisée pour les expérimentations d'hybridation d'acides nucléiques et les applications de transfert

Stringence = terme utilisé pour décrire les conditions physico-chimiques d'appariement de l'ARN ou de l'ADN (concentration en sels, température, pH)

SVF = Sérum de Veau Fœtal

TBE = Tris Borate acide Ethylène-Diamine-Tétra Acétique sous forme de sel sodique, Solution Tampon utilisée en électrophorèse pour la migration des acides nucléiques en gel d'agarose

TE = Tris EDTA (acide Ethylène-Diamine-Tétra Acétique sous forme de sel sodique), Solution Tampon utilisée pour la solubilisation des acides nucléiques, permettant la protection de ces derniers de la dégradation

UI = Unité Internationale

UTR = Untranslated Region, région non traduite d'un ARN messager (ARNm), placée soit en amont du codon d'initiation (5' UTR), soit en aval du codon STOP (3' UTR)

SOMMAIRE

Merci, Merci, Merci...

Nomenclatures utilisées

Liste des abréviations - Définitions

Sommaire

Liste des Figures et Tableaux

A/ Introduction	1
Avant-propos : Organisation de l'élevage ovin en France	3
I- Un peu de physiologie de la reproduction chez les ruminants	5
1. Anatomie utérine des ruminants	5
2. Cycle œstral chez la brebis (<i>Ovis aries</i>)	9
3. Gestation chez la brebis (<i>Ovis aries</i>)	11
4. Survie embryonnaire	11
II- Médiation lipidique et gestation	13
1. Les acides gras	13
2. Un cas particulier : l'Acide Arachidonique (AA)	15
3. Les lipoxygénases	17
3.1. Classification des Lipoxygénases chez les mammifères	17
3.2. Structure moléculaire des lipoxygénases de mammifères	21
3.3. Fonctions biologiques des lipoxygénases de mammifères	21
III- Contexte et projet de recherche	25
1. Contexte et résultats préliminaires	25
1.1. Identification des métabolites de l'acide arachidonique produits par l'endomètre ovin	27
1.2. Caractérisation de la 12-lipoxygénase d'endomètre ovin : Mise en évidence et Analyse par RT-PCR	27
1.3. Localisation de l'ARN messenger codant pour la 12-lipoxygénase dans l'endomètre de brebis	29
1.4. Recherche des transcrits de la 12-lipoxygénase dans divers organes ovins	31
1.5. Cinétique d'expression des transcrits de la 12-lipoxygénase au cours du cycle œstral et en début de gestation	31
2. Problématique et objectifs des travaux de ce projet	33

B/ Matériels et Méthodes	39
I- Animaux utilisés dans ce projet	41
1. Petits ruminants : Une espèce ovine, la brebis (<i>Ovis aries</i>)	41
2. Lagomorphe : Le lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) et protocole d'immunisation pour l'obtention d'anticorps anti-12-lipoxygénase ovine	43
2.1. Choix des peptides	43
2.2. Immunisation	43
2.3. Purification des anticorps	45
II- Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)	47
III- Biologie moléculaire au sein de ce projet	49
1. Extraction des ARNs totaux de tissus et cellules luminales de brebis	49
2. RT-PCR pour la recherche du type de 12-lipoxygénase	49
2.1. Transcription Inverse (ou RT)	49
2.2. Amplification en chaîne par Polymérisation (ou PCR)	49
3. Northern blot	51
4. Amplification Rapide des extrémités d'ADNc (<i>RLM-RACE</i>)	53
4.1 Préparation des ARN	53
4.2. Transcription inverse des ARNs messagers	53
4.3. PCR "nichée" pour 5' <i>RLM-RACE</i>	55
5. Sous-clonage (par TA Cloning) d'ADNc entiers en vecteur <i>pGEM®-T Easy</i>	55
5.1. Le plasmide <i>pGEM®-T Easy</i>	55
5.2. Ligation de l'amplicon dans le plasmide	55
5.3. Transformation bactérienne et culture sur milieu solide des bactéries	57
5.4. Contrôle de la présence de l'insert dans les colonies bactériennes par PCR	57
5.5. Mise en culture liquide et conservation des clones	57
5.6. Purification des plasmides	57
5.7. Séquençage de l'insert	59
6. Mise en évidence de variants d'épissage par PCR semi-quantitative	59
IV- Conception - Obtention des vecteurs d'expression en système eucaryote	59
1. Conception des amorces pour la synthèse des ADNc de chacun des transcrits de la 12-lipoxygénase ovine	61
2. Choix des matrices pour les amplifications	61
3. PCR pour la production des amplicons à insérer en vecteur pCMV β	61
4. Digestions enzymatiques	63
5. Ligation et transformation en bactéries <i>E. coli</i> DH5 α	63
6. Sélection d'un clone par type de construction en plasmide pCMV	63
7. Digestion enzymatique de plasmides pCMV par l'enzyme <i>SacI</i>	65
8. Correction d'un plasmide par excision d'un insert surnuméraire : Utilisation de l'ER <i>MluI</i>	65
9. Correction d'un plasmide par extraction/remplacement d'une partie de séquence mutée	65
10. Correction d'une mutation unique par mutagenèse dirigée	65

V- Transfection <i>in vitro</i> dans une lignée de cellules COS-7	69
1. Culture de cellules COS-7	69
2. Transfection de cellules COS-7	69
3. Récupération des cellules à l'issue de la transfection	71
VI - Immunocytochimie en fluorescence	71
VII- Western blot	73
1. Préparation des échantillons (cellules ovines, cellules COS-7)	73
2. Séroneutralisation des immunosérums de lapins par le sérum normal de brebis	75
3. Immunoneutralisation des immunosérums de lapins par les peptides respectifs	75
4. Electrophorèse sur gel, transfert sur membrane et immunoblot	75
VIII- Extraction des protéines recombinantes	77
IX- Purification des protéines recombinantes : Chromatographie d'affinité His Tag	79
X- Mesure d'activité de conversion de l'A.A. en 12-HETE	79
1. Test d'activité de conversion des protéines recombinantes respectives	81
2. Compétition des deux formes 12LOX vis-à-vis de l'activité de conversion de l'acide arachidonique	81
C/ Résultats expérimentaux	85
I- Isolement et caractérisation des 2 transcrits de la 12-lipoxygénase ovine	91
1. RACE / Clonage des ADNc en vecteur <i>pGEM®-T Easy</i> / Séquençage	91
2. Mise en évidence de variants d'épissage par PCR semi-quantitative	95
II- Production <i>in vitro</i> de protéines recombinantes par un modèle eucaryote : transfection transitoire en cellules COS-7	95
A- Conception de Vecteurs d'expression pCMV avec/sans Tag Histidine	95
1. Généralités	95
1.1. Constructions plasmidiques souhaitées	95
1.2. Choix des matrices pour les amplifications	99
1.3. Conception des amorces pour la synthèse des ADNc de chacun des transcrits de la 12-lipoxygénase ovine	99
1.4. Préparation du vecteur receveur pCMV β	99
2. Vecteurs eucaryotes pCMV avec la forme courte L4 du transcrit de la 12-lipoxygénase	101
2.1. Synthèse des ADNc de la forme courte L4 (+/- Tag HIS)	101
2.2. Contrôle des constructions L4 (+/- Tag HIS)	101
2.2.1. Sélection de clones et premières analyses	101

2.2.2. Correction du clone E2 pour la construction L4 avec Tag HIS et premières analyses	103
3. Vecteurs eucaryotes pCMV avec la forme LN10 longue du transcrit de la 12-LOX	105
3.1. Synthèse des ADNc de la forme normale LN10 (+/- Tag HIS)	105
3.2. Contrôle des constructions LN10 (+/- Tag HIS)	105
3.3. Correction des mutations par extraction/remplacement d'une partie de séquence	107
3.4. Contrôle des constructions LN10 (+/- Tag HIS)	109
3.5. Correction d'une mutation unique par mutagenèse dirigée	111
B- Transfection transitoire de cellules COS-7 avec les constructions pCMV avec/sans Tag Histidine	111
1. Analyse des cellules COS-7 par Immunocytochimie	111
2. Recherche et analyse des protéines recombinantes synthétisées sur extraits cellulaires entiers de COS-7	
Caractérisation des immunsérums de lapins anti-peptides	113
2.1. Caractérisation des sérums anti-peptides LN10 et L4 sur cellules COS-7	115
2.1.1. Fonctionnalité des sérums anti-peptides produits chez le lapin	115
2.1.2. Détection des protéines recombinantes à queue poly-Histidine	115
2.1.3. Spécificité des immunsérums	115
2.1.4. Tests de purification des IgG des immunsérums de lapins	117
C- Recherche de la 12-lipoxygénase dans l'endomètre de brebis : utilisation des anti-peptides	117
2.1. Tests de fonctionnalité des anti-peptides sur les tissus ovins	117
2.2. Expression de la 12-lipoxygénase au cours du cycle œstral et en début de gestation dans l'endomètre de brebis	123
IV. Activité enzymatique des protéines recombinantes produites en système eucaryote	125
A- Solubilisation - Purification des protéines recombinantes des deux formes de 12LOX	125
1. Obtention de protéines recombinantes en phase soluble avant purification	125
2. Purification des protéines recombinantes à queue Poly-Histidine sur colonnes <i>Pierce® HisPur™</i>	125
B- Activité biologique des protéines recombinantes des deux formes de 12LOX	129
1. Mesure d'activité de conversion de l'A.A. en 12-S-HETE sur extraits de protéines totales de COS-7	129
2. Test de compétition des deux formes de protéines vis-à-vis du substrat	129
2.1. Sur extraits de protéines totales de cellules COS-7	131
2.2. Sur protéines taguées Histidine, purifiées	131

D/ Discussion	135
I- Bilan expérimental du projet	137
II- Analyse des transcrits et conséquences sur la synthèse des protéines correspondantes	139
1. Expression du transcrit de la 12-lipoxygénase dans divers tissus ovins	139
2. Existence de variants d'épissage potentiellement traductibles en protéines : Analyse des séquences des deux transcrits de la 12-Lipoxygénase ovine	141
3. Expression des 2 transcrits de la 12-lipoxygénase pendant le cycle œstral et en début de gestation : Influence de l'environnement hormonal	143
III- Recherche des protéines correspondantes à la 12-lipoxygénase de l'endomètre ovin	145
1. Obtention des anti-peptides et fonctionnalité de ces réactifs	145
2. Purification des immunsérums anti-peptides produits au laboratoire	149
3. Absence de détection de la forme courte de la protéine 12LOX L4	149
4. Extraction et purification des protéines recombinantes 12-Lipoxygénase : problème de solubilisation en phase aqueuse	151
4.1. Protéines recombinantes 12-lipoxygénase : taguées ou non...	151
4.2. Activité biologique des protéines recombinantes	155

E/ Annexe : Poster congrès ICAR 2016

(18th International Congress on Animal Reproduction), Tours (France),
26 au 30 juin 2016.

F/ Références bibliographiques

Liste des Figures

Introduction

Figure 1	<i>Disposition du système reproducteur de la brebis, indiquant la situation des différents organes et glandes dans l'abdomen</i>	4
Figure 2	<i>Anatomie du système reproducteur ovin, indiquant les différentes composantes de l'utérus</i>	4
Figure 3	<i>Coupe transversale de corne utérine (ici chez la lapine)</i>	6
Figure 4	<i>Utérus bovin pendant le cycle œstral</i>	6
Figure 5	<i>Coupe transversale de corne utérine ovine à 12 jours du cycle œstral</i>	7
Figure 6	<i>Représentation d'une coupe transversale d'un ovaire de brebis</i>	8
Figure 7	<i>Cycle sexuel chez la brebis</i>	8
Figure 8	<i>Fœtus ovin d'environ 60 jours, in situ dans l'utérus maternel ouvert</i>	10
Figure 9	<i>Structure et métabolisme des acides gras ω-3 et ω-6</i>	12
Figure 10	<i>Voies de métabolisme de l'acide arachidonique</i>	14
Figure 11	<i>Production d'icosanoïdes bioactifs via le métabolisme de l'Acide arachidonique (AA) par les voies des Lipoxygénases et des cyclooxygénases</i>	14
Figure 12	<i>Représentation schématique de la protéine 12/15-Lipoxygénase de lapin</i>	20
Figure 13	<i>Fonctions biologiques des Lipoxygénases</i>	20
Figure 14	<i>Séparation chromatographique (HPLC Phase inverse) des éicosanoïdes produits par l'épithélium luminal d'endomètre ovin à 14 jours du cycle œstral</i>	26
Figure 15	<i>Positions des amorces oligonucléotidiques sur les séquences ADNc bovines correspondant aux 2 types de 12-lipoxygénases (plaquettaire, leucocytaire)</i>	28
Figure 16	<i>Recherche par RT-PCR des transcrits de la 12-lipoxygénase exprimés par les cellules épithéliales d'endomètre utérin ovin. Détermination du type de 12-LOX.</i>	28
Figure 17	<i>Localisation par Hybridation in situ des ARN messagers de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire sur coupes d'utérus ovin à 9 jours du cycle œstral</i>	30
Figure 18	<i>Recherche du transcrit de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire par Northern blot dans divers tissus ovins de nature épithéliale</i>	32

Figure 19a	<i>Expression des ARN messagers de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules luminales de l'endomètre ovin au cours du cycle œstral et en début de gestation. Analyse par Northern blot.</i>	34
Figure 19b	<i>Quantification de l'Expression des deux ARN messagers de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules luminales de l'endomètre ovin au cours du cycle œstral et en début de gestation (Northern blot).</i>	34
Figure 20	<i>Représentation schématique de la purification de protéines recombinantes utilisant un tag peptidique</i>	36

Matériels et Méthodes

Figure 21	<i>Schéma de maîtrise hormonale du cycle œstral et de mise en gestation appliqué à l'espèce ovine en élevage</i>	40
Figure 22	<i>Alignement des séquences peptidiques déduites des deux transcrits 12-lipoxygénase clonés en plasmides pGEM®-T Easy. Utilisation du logiciel CLUSTAL W2 de la suite EMBOSS.</i>	42
Figure 23	<i>Chronogramme du protocole d'immunisation des lapins par peptide</i>	44
Figure 24a	<i>Principe de purification des immunoglobulines IgG par chromatographie d'affinité sans bras espaceur (à gauche) ou avec bras espaceur (à droite)</i>	44
Figure 24b	<i>Principe de purification des immunoglobulines IgG par chromatographie d'affinité "SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides"</i>	46
Figure 25	<i>Schémas résumant les étapes de la technique de RLM-RACE 5' et 3' (Extrait du manuel du kit AMBION "First Choi e™ RLM-RACE")</i>	52
Figure 26	<i>Détail des séquences référentes situées sur le plasmide pGEM®-T Easy (Promega)</i>	56
Figure 27	<i>Séquence et site de multi-clonage du vecteur pGEM®-T Easy</i>	58
Figure 28	<i>Schémas simplifiés des vecteurs pCMV 12-lipoxygénase pour chacun des ADNc insérés (Forme courte L4, Forme normale LN10)</i>	62
Figure 29	<i>Schéma du principe de correction de la mutation des 2 constructions plasmidiques correspondant à la forme normale du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine (pCMV LN10 +TAG3, pCMV LN10-TAG3)</i>	66
Figure 30	<i>Principe de réaction du kit "ECL2 Western Blot Detection" (Pierce®, Thermofisher)</i>	76
Figure 31	<i>Procédure d'extraction des protéines recombinantes de cellules COS-7 transfectées</i>	76

Résultats expérimentaux

Figure 32a	<i>Représentation du gène (A), du transcrit (B) et de la protéine (C) de la 12-lipoxygénase ovine référencés dans les banques de séquences</i>	90
Figure 32b	<i>Alignement de la séquence nucléotidique du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine forme courte L4 avec sa séquence peptidique déduite</i>	92
Figure 32c	<i>Alignement de la séquence nucléotidique du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine forme normale LN10 avec sa séquence peptidique traduite</i>	93
Figure 33	<i>Détection par RT-PCR (35 cycles) des deux transcrits de la 12-lipoxygénase exprimés par l'épithélium luminal d'endomètre de brebis</i>	94
Figure 34a	<i>Cartes des vecteurs d'expression eucaryote conçus à partir du plasmide pCMVB (BD Biosciences Clontech) (Conception via SnapGene®)</i>	96
Figure 34b	<i>Schéma simplifié du vecteur eucaryote pCMV 12-lipoxygénase pour chacun des ADNc insérés (Forme courte L4, Forme normale LN10)</i>	97
Figure 35	<i>Préparation des amplicons de la forme courte L4 de la 12-lipoxygénase et du vecteur receveur pCMVB en vue d'une ligation/transformation</i>	98
Figure 36	<i>Tri par PCR et digestions contrôles par les ER <i>SacI</i> ou <i>MluI</i> pour la sélection de clones bactériens correspondant à la forme courte du transcrit de la 12-lipoxygénase (Forme taguée et non taguée Histidine)</i>	100
Figure 37	<i>Digestion par <i>MluI</i> du plasmide correspondant au clone E2 de la forme courte L4 du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine</i>	102
Figure 38	<i>Synthèse des amplicons LN10 +/- TAG3 et digestion par l'enzyme de restriction <i>NotI</i></i>	104
Figure 39	<i>Tri par PCR de clones bactériens correspondant à la forme normale LN10 du transcrit de la 12-lipoxygénase (Forme taguée et non taguée Histidine)</i>	104
Figure 40	<i>Positionnement des amorces utilisées pour le séquençage des deux constructions pCMV 12LOX de la forme longue LN10 (Clone G42 avec Tag HIS, Clone H53 sans Tag HIS), après correction par mutagenèse dirigée</i>	126
Figure 41	<i>Correction des mutations par digestion/remplacement pour chacun des 2 plasmides de clones retenus pour la surexpression de la forme normale du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine (constructions LN10 +/- TAG3)</i>	108
Figure 42	<i>Positionnement des amorces utilisées pour le séquençage des deux constructions pCMV 12LOX de la forme courte LN10 (Clone G42 avec Tag HIS, Clone H53 sans Tag HIS) après correction par mutagenèse dirigée</i>	110
Figure 43	<i>Recherche des 2 formes de protéines recombinantes 12-lipoxygénase ovine produites en cellules COS-7 transfectées par les plasmides pCMV L4 ou pCMV LN10. Mise en évidence par immunofluorescence post-fixation au paraformaldéhyde 4%.</i>	112
Figure 44	<i>Détection des protéines recombinantes 12-lipoxygénases (forme courte L4 et forme normale LN10) dans les cellules COS-7 transfectées par les plasmides pCMV 12LOX. Western blot sur des extraits totaux de protéines (10µg par puits).</i>	114
Figure 45	<i>Purification des immunsérums de lapins immunisés par les peptides spécifiques des formes normale LN10 et courte L4 de la protéine 12-lipoxygénase ovine. Analyse des anti-peptides par Western blot.</i>	116

Figure 46	<i>Recherche de la 12-lipoxygénase (Forme normale LN10) dans les tissus ovins. Utilisation de l'immunsérum de lapin anti-peptide LN10. Analyse par Western blot sur des extraits de protéines totales de cornées et d'épithélium luminal utérin (20 µg par puits).</i>	118
Figure 47	<i>Tests d'immunoneutralisation des sérums de lapins par les peptides</i>	118
Figure 48	<i>Recherche des 2 formes de 12-lipoxygénase (courte L4 et normale LN10) dans l'épithélium luminal ovin à l'aide des immunsérums de lapins. Test d'immunoneutralisation des 2 sérums par les peptides correspondant à ces 2 formes. Analyse par Western blot d'extraits totaux de protéines de tissu luminal (20µg par puits) et de cellules COS-7 transfectées (10 µg par puits). Les deux parties de figure sont indépendantes (L4 à gauche, LN10 à droite).</i>	120
Figure 49	<i>Expression de la protéine 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules lumineuses de l'endomètre ovin. Analyse par western blot sur des extraits de protéines totales d'épithélium luminal utérin à différents stades du cycle œstral et en début de gestation (20 µg par puits).</i>	122
Figure 50	<i>Test de solubilisation des protéines recombinantes de la 12-lipoxygénase (2 formes : courte L4, normale LN10). Action de 4 détergents avec sonication et centrifugations successives sur des culots de cellules COS-7 transfectées pour chacune des formes de 12-lipoxygénase.</i>	124
Figure 51	<i>Purification des protéines recombinantes 12-lipoxygénase avec tag Histidine. Analyse des diverses fractions collectées par Chromatographie d'affinité sur colonne HisPur™ Cobalt Co²⁺.</i>	126
Figure 52	<i>Evaluation de l'activité enzymatique des protéines 12-lipoxygénases recombinantes (Formes courte L4 et normale LN10, avec/sans Tag Histidine). Mesure du métabolite 12-HETE par Chromatographie HPLC avec détection radioactive sur des extraits de protéines totales de cellules COS-7 transfectées.</i>	128
Figure 53	<i>Test de compétition vis-à-vis du substrat des 2 protéines recombinantes 12-lipoxygénases produites en cellules COS-7 transfectées (forme courte L4 et forme normale LN10). Test sur extraits de protéines totales.</i>	130
Figure 54	<i>Test de compétition vis-à-vis du substrat des 2 protéines recombinantes 12-lipoxygénases à queue poly-Histidine, purifiées par affinité (Cobalt Co²⁺) et produites en cellules COS-7 transfectées (forme courte L4 et forme normale LN10).</i>	132

Discussion

Figure 55	<i>Processus de maturation d'un transcrit primaire par différentes transformations post-traductionnelles au sein du noyau de la cellule</i>	140
Figure 56	<i>Processus de maturation des transcrits primaires</i>	140
Figure 57	<i>Effets des hormones ovariennes et des facteurs issus de l'endomètre et du trophoctoderme embryonnaire sur l'expression de gènes en lien avec l'élongation et l'implantation de l'embryon. Expression de ces gènes dans les épithéliums endométriaux de l'utérus ovin pendant la gestation précoce</i>	144
Figure 58	<i>Voie de biogenèse d'un microARN et mode d'action chez les métazoaires</i>	150
Figure 59	<i>Schémas simplifiés des deux vecteurs pET-16b et pCMVB permettant l'obtention de protéines 12-lipoxygénases à queue poly-Histidine</i>	152

Figure 60 *Représentation schématique de la forme "normale" de la protéine 12-lipoxygénase ovine. Utilisation du logiciel Prosite (via Expasy) pour la recherche de motifs connus.* 154

Liste des Tableaux

Introduction

Tableaux 1a et 1b	<i>Gènes codant pour les Lipoxygénases chez 3 espèces de mammifères</i>	16
Tableau 2	<i>Famille des gènes spécifiques des lipoxygénases humaines et murines</i>	16
Tableau 3	<i>Amorces oligonucléotidiques spécifiques des ADNc des 2 types de 12-lipoxygénases identifiés chez l'espèce bovine</i>	29

Matériels et Méthodes

Tableau 4	<i>Séquences des amorces oligonucléotidiques du kit "FirstChoice™ RLM-RACE"</i>	54
Tableau 5	<i>Amorces nucléotidiques utilisées pour la recherche des variants du transcrit de la 12-lipoxygénases identifiés dans l'utérus ovin</i>	58
Tableau 6	<i>Amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier les ADNc correspondant à la forme normale (LN10) et la forme courte (L4) de la 12-lipoxygénase ovine pour insertion en vecteur eucaryote pCMVβ</i>	60
Tableau 7	<i>Amorces nucléotidiques utilisées pour le tri des clones bactériens correspondant aux constructions de la forme courte L4 et de la forme normale LN10 de la 12-lipoxygénase en plasmide pCMV</i>	62
Tableau 8	<i>Amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier les plasmides entiers pCMV des 2 constructions de la forme normale de la 12-lipoxygénase présentant la même mutation. Correction par PCR avec une Taq ADN polymérase haute fidélité (Taq Phusion™).</i>	67
Tableau 9	<i>Anticorps primaires utilisés pour l'ensemble des Western blots effectués sur tissus ovins et cellules COS-7 transfectées</i>	72
Tableau 10	<i>Protocole adapté pour le test de compétition des deux formes de protéines 12-lipoxygénase recombinantes purifiées</i>	82

Résultats expérimentaux

Tableau 11	<i>Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage</i>	106
Tableau 12	<i>Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage des constructions pCMV 12LOX LN10 +/- TAG3 après correction des mutations par extraction/remplacement d'une partie de séquence</i>	109
Tableau 13	<i>Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage des constructions pCMV 12LOX LN10 +/- TAG3 après correction des plasmides par mutagenèse dirigée</i>	110

Discussion

Tableau 14	<i>Effets de la progestérone ovarienne (P4) et de l'infusion intra-utérine d'interféron Tau (IFN τ) ou de prostaglandines (PG) sur les gènes impliqués dans l'élongation et l'implantation. Ces gènes sont exprimés par les épithéliums de l'endomètre utérin ovin</i>	146
------------	--	-----

A/ Introduction

Avant-propos : Organisation de l'élevage ovin en France

L'élevage ovin français représente un cheptel total de 7,2 millions de têtes dont 5,5 millions de brebis et agnelles (Interbev 2015) (sources Enquêtes SSP novembre 2014, BDNI et Races de France 2014). La filière ovine française représente 65 547 élevages allaitants, 5 615 élevages laitiers et 860 élevages mixtes. Environ 50 races ovines à viande, d'effectifs très différents, sont recensées en France (Pellicer-Rubio *et al.*, 2009).

Ainsi, la filière est le 1er secteur agricole en terme d'emplois (500 000 emplois directs ou indirects estimés) (sources Etats Généraux de l'Interprofession Bétail et Viande & Coop de France 2014).

En France, les systèmes de production d'agneaux sont d'une très grande diversité. Cela est dû au rythme de reproduction rapide de cette espèce, à l'aptitude de certaines races au désaisonnement et à un temps court et modulable nécessaire à l'engraissement final des agneaux.

L'élevage ovin français s'articule autour de 2 filières :

- la viande : cette production concerne 90% des exploitations en France. Les agneaux sont élevés dans l'exploitation dans laquelle ils sont nés. Selon la région, l'élevage se fera en plein air ou en bergerie. Mais entre ces 2 systèmes d'exploitation, d'autres intermédiaires sont possibles.

- le lait : cette production concerne environ 10% des exploitations, essentiellement présentes dans le rayon de Roquefort (Aveyron, Lozère, Tarn), les Pyrénées Atlantiques et la Corse. Dans ces élevages laitiers, le lait permet la fabrication de fromage. Les agneaux, sont vendus non sevrés, aux alentours de 45 jours à Noël ou à Pâques, ce sont les agneaux de lait ou agneaux légers.

Compte tenu de ces données (Interbev 2015), l'élevage ovin français représente un pan important, d'un point de vue économique, des filières viande et lait. Afin de rester concurrentiel économiquement, l'élevage subit un important renouvellement de ses effectifs par de nombreuses naissances nécessaires pour remplacer les animaux alimentant les marchés de la consommation.

Afin d'optimiser les rendements, il est indispensable de comprendre et de maîtriser les étapes de la fécondation, savoir détecter les réussites ou échecs de celle-ci, et de comprendre et maîtriser au mieux le déroulement de la gestation.

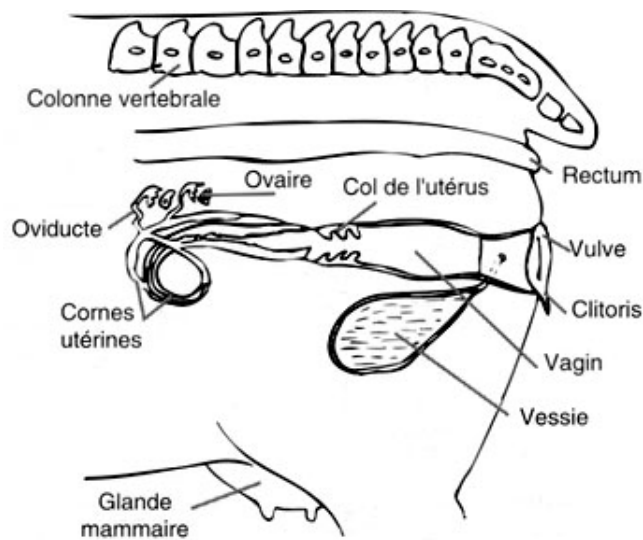


Figure 1 Disposition du système reproducteur de la brebis, indiquant la situation des différents organes et glandes dans l'abdomen (Boukhliq 2002)

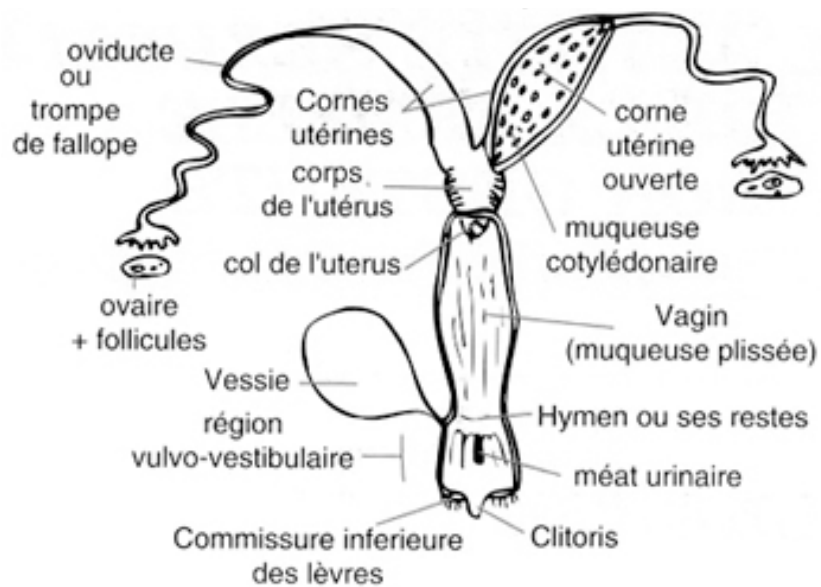


Figure 2 Anatomie du système reproducteur ovin, indiquant les différentes composantes de l'utérus (Boukhliq 2002)

I- Un peu de physiologie de la reproduction chez les ruminants

Parmi les différentes composantes qui, depuis la production des gamètes jusqu'à la parturition, contribuent à la fertilité, les interactions entre l'embryon et l'utérus au cours de la période péri-implantatoire représentent une étape clef dont le déroulement conditionne l'issue de la gestation (Forde *et al.*, 2012). Chez les ruminants, il est établi que la mortalité embryonnaire est la cause principale des échecs de gestation. Cette mortalité embryonnaire précoce est, par exemple, à l'origine de la baisse de fertilité observée au sein des élevages bovins laitiers dont les conséquences économiques sont importantes pour la filière dans les pays industrialisés.

L'établissement de la gestation est associé à de nombreux événements physiologiques qui se déroulent au cours de la période péri-implantatoire. Chez les espèces ruminantes, l'implantation tardive (deux à trois semaines post-fécondation) s'accompagne d'un important changement de taille du conceptus (élongation) au sein duquel se mettent en place les différenciations cellulaires essentielles pour le développement de l'unité foeto-placentaire. Cette période péri-implantatoire correspond également à la phase de reconnaissance maternelle de la gestation, au cours de laquelle l'endomètre préparé par les stéroïdes ovariens (c'est la réceptivité utérine) réagit à une grande variété de signaux moléculaires produits par le conceptus. Réciproquement, les signaux d'origine utérine vont exercer un contrôle sur le développement du conceptus. Ces signaux sont de nature variée et ils sont soumis à l'influence des conditions environnementales dans lesquelles l'animal évolue, notamment celles liées à l'alimentation.

Chez les mammifères, la coordination de ces événements met en jeu des cascades de gènes complexes et finement régulées impliquant une multitude de facteurs sécrétés, membranaires et intracellulaires.

Les travaux effectués au laboratoire visent à déterminer : (i) les mécanismes moléculaires et cellulaires qui gouvernent le développement des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires composant le conceptus et contrôlent sa morphogenèse; (ii) la préparation et l'adaptation de l'environnement maternel à la présence du conceptus, aux niveaux local et systémique; (iii) les conséquences sur les interactions conceptus-utérus d'altérations affectant le conceptus (ex : capacité de développement à terme) mais également l'organisme maternel (ex : contraintes métaboliques).

La maîtrise de la reproduction des animaux d'élevage passe donc par une connaissance des phénomènes moléculaires associés à la mise en place de la gestation pour un maintien et un développement pérenne de l'embryon *in utero*.

Les interactions moléculaires et cellulaires entre l'embryon et l'utérus maternel sont de diverses natures mais la médiation lipidique, lors d'un tel événement, reste un phénomène très important.

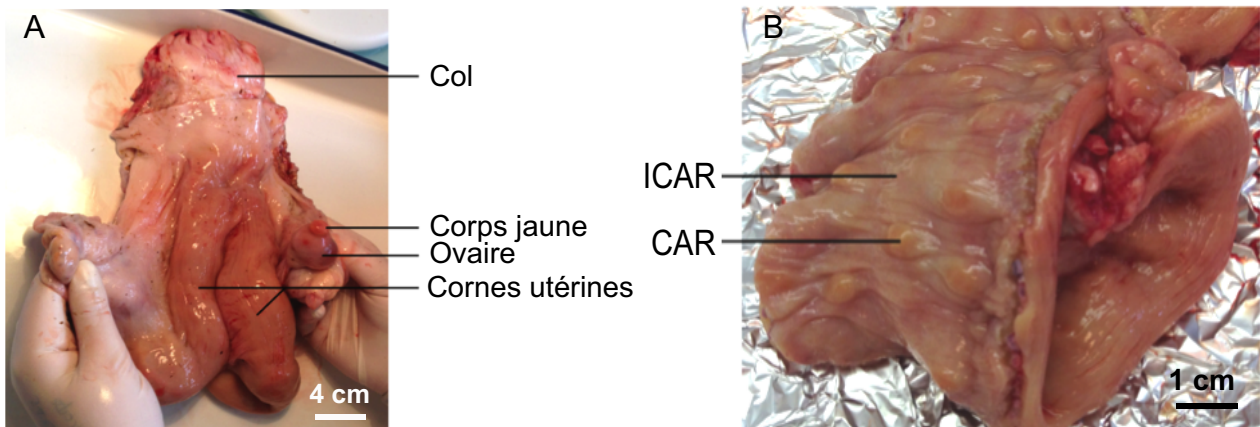
1. Anatomie utérine des ruminants

(Castonguay 2012)

L'utérus est l'organe reproducteur chez la plupart des espèces de mammifères. C'est l'organe de la gestation, l'implantation et le développement du fœtus s'y déroulant. Son rôle est d'assurer le développement du fœtus par ses fonctions nutritionnelles et protectrices.

Chez la brebis, l'appareil génital, situé dans la cavité abdominale, peut être divisé en six parties principales : la vulve, le vagin, le col de l'utérus, le corps utérin, l'oviducte et les ovaires (voir *Figures 1 et 2*). Les dimensions du système reproducteur varient d'une brebis à l'autre.

La première partie de l'utérus se nomme le corps et a une longueur d'à peine 1 à 2 cm. L'utérus se divise ensuite en deux parties pour former les cornes utérines d'une longueur de 10 à 15 cm. Les cornes utérines sont côte à côte sur une bonne partie de leur longueur et leur partie libre, dirigée latéralement, s'atténue en circonvolution (voir *Figure 3 Photo A*). D'une largeur d'environ 10 mm, elles s'effilent vers l'oviducte où leur diamètre n'atteint plus qu'environ 3 mm.



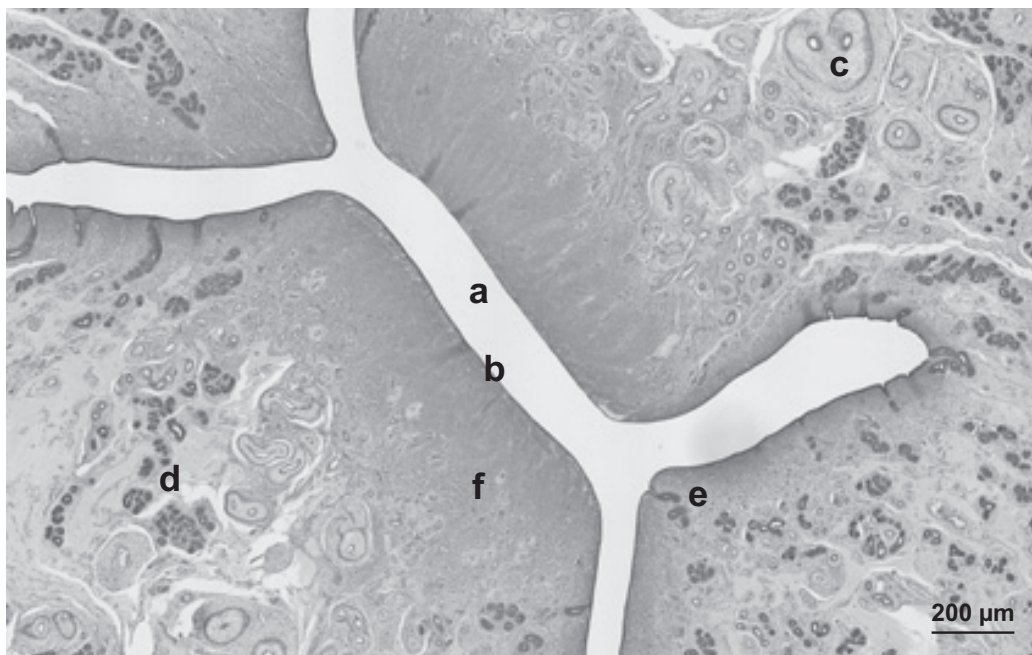
(Photo de C. Eozenou - 2013 - UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France)

Figure 3 *Utérus bovin pendant le cycle œstral*

Photo A Utérus entier de vache dont les deux cornes sont bien visibles.

Photo B Corne utérine ouverte longitudinalement. Les caroncules (CAR) et les Intercaroncules (ICAR) sont indiquées.

Les structures observées ici chez la vache sont retrouvées de façon similaire chez la brebis.



(Photo de P. Renaud - UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France)

Figure 4 *Coupe transversale de corne utérine ovine à 12 jours du cycle œstral*

- | | |
|----------------------------------|--|
| a = Lumière utérine | d = Cellules glandulaires profondes |
| b = Bordure d'épithélium luminal | e = Cellules glandulaires superficielles |
| c = Vaisseau sanguin | f = Stroma |

Plusieurs tuniques composent la paroi de l'utérus des ruminants (voir *Figure 5*), de l'extérieure vers l'intérieur) : séreuse, musculuse et muqueuse, respectivement nommées *perimetrium*, myomètre et endomètre (Dumoulin 2004) :

- Le *perimetrium*, tunique séreuse externe de l'utérus, est un tissu conjonctivo-élastique, riche en vaisseaux et en nerfs,
- Le myomètre, couche musculaire dont les contractions sont impliquées dans le transport des spermatozoïdes vers l'oviducte et dans l'expulsion du ou des fœtus au moment de la mise bas.
- Enfin, l'endomètre, muqueuse jouant un rôle primordial dans la survie et le développement du fœtus pendant la gestation. Il produit les sécrétions indispensables à l'élongation du conceptus (Spencer *et al.*, 2008) qui sont soumises à l'influence des conditions environnementales dans lesquelles l'animal évolue, notamment celles liées à l'alimentation. On y retrouve une multitude de vaisseaux sanguins.

L'endomètre comporte :

- * un épithélium pourvu de cellules ciliées, composant une bordure en surface, constituée de cellules luminales et de cellules sécrétrices (cellules glandulaires) (voir *Figure 4*),
- * une épaisse *propria*, tissu conjonctif lâche sous-épithélial, dont la partie profonde tient lieu de sous-muqueuse (ou stroma). L'épithélium envoie des expansions glandulaires, qui occupent toute la hauteur de la *propria*. Des zones de la *propria* fortement épaissies, et riches en fibroblastes forment des élévations ovoïdes, longitudinales : il s'agit-là des caroncules utérines, au nombre de 80 à 120 chez la vache (voir *Figure 3 Photo B*), 70 à 100 chez la brebis. Leur vascularisation est abondante et de gros vaisseaux basaux occupent leur centre. Elles constituent les points d'attachement des membranes fœtales durant la gestation, les zones lisses entre ces structures étant désignées par le terme "intercaroncules". Au cours de la gestation, chaque caroncule devient volumineuse et forme un gros tubercule saillant, pédonculé, de couleur rouge sombre et d'aspect spongieux. L'ensemble forme, avec les micro cotylédons du conceptus, un placenta de type « cotylédonaire ». Les caroncules préfigurent la composante maternelle des placentomes. Des glandes utérines sont réparties dans l'endomètre. Leur structure est tubulaire, ramifiée ou torsadée. Leur activité varie avec le stade du cycle œstral et leurs sécrétions jouent un rôle important dans le développement de l'embryon, mais probablement aussi dans les modifications des spermatozoïdes juste avant la fécondation (Boukhliq 2002).

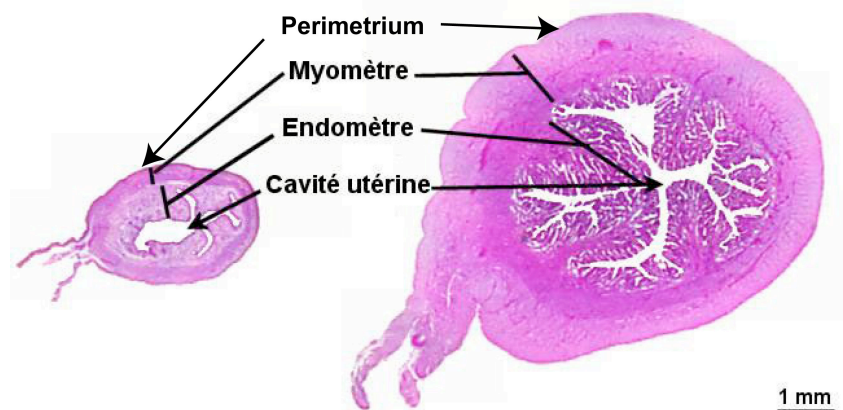


Figure 5 Coupe transversale de corne utérine (ici chez la lapine)(D'après D. Fagès et M.L. Gueuné)

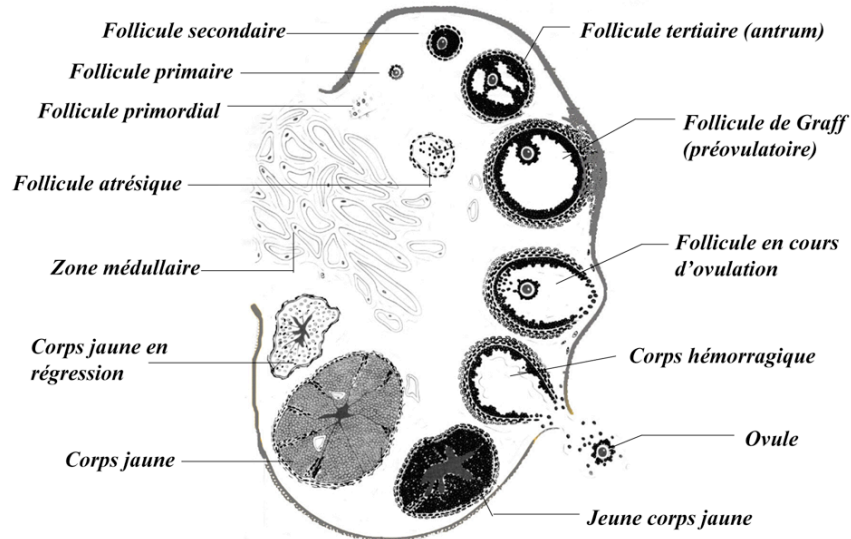


Figure 6 Coupe transversale d'un ovaire de brebis (D'après Bonnes et al, *Reproduction des mammifères d'élevage*, Collection INRAP, Editions Foucher, 1988)

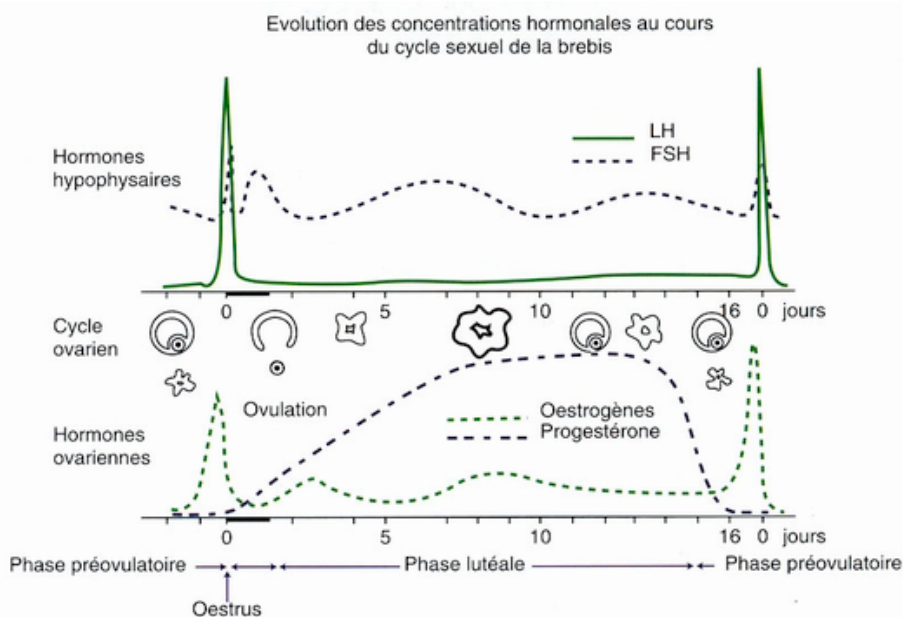


Figure 7 Cycle sexuel chez la brebis (Boukhliq 2002)

Le cycle œstral de la brebis, qui dure 14 à 17 jours selon la race (Zarco *et al.*, 1988) est caractérisé par une phase folliculaire courte. La lente montée de FSH hypophysaire se produit entre le 14^{ème} et le 15^{ème} jour du cycle, entraînant la maturation du follicule pré-ovulatoire. L'augmentation dans le même temps d'oestradiol folliculaire induit, par rétroaction positive, la décharge de gonadotrophines (LH et FSH) qui déclenche l'ovulation 16 à 36 heures après l'œstrus. L'installation du corps jaune se fait suite à l'ovulation. Tout au long de la phase lutéale, le corps jaune sécrète des quantités croissantes de progestérone dont le taux circulant maximum est atteint huit jours après l'œstrus. A partir du 13^{ème} jour (post-œstrus), le corps jaune régresse rapidement et cesse de sécréter la progestérone : c'est la lutéolyse, qui marque la fin du cycle œstral (Driancourt *et al.*, 1991).

Quant aux ovaires (voir *Figure 6*), ce sont de petits organes en forme d'amande (2 cm de longueur x 1 cm d'épaisseur) dont le poids varie en fonction de l'activité ovarienne. Chaque femelle possède deux ovaires qui ont pour fonctions de produire les gamètes femelles (ovules) ainsi que certaines hormones sexuelles femelles, principalement la progestérone et les œstrogènes, qui maintiennent les caractéristiques sexuelles et contrôlent partiellement plusieurs fonctions de la reproduction.

2. Cycle œstral chez la brebis (*Ovis aries*) (Castonguay 2012)

Le cycle sexuel, qui représente l'intervalle entre deux chaleurs consécutives (= l'œstrus, ou chaleurs), définit la période lors de laquelle la femelle démontre sa réceptivité sexuelle en acceptant l'accouplement. Il est en moyenne de 17 jours chez la brebis, et peut varier entre 14 et 19 jours selon les races, l'âge, les individus et la période de l'année. Le cycle est divisé en deux phases : folliculaire (ou pré-ovulatoire) et lutéale (voir *Figure 7*).

La succession des événements physiologiques qui génère le cycle sexuel chez la brebis dépend d'interactions entre plusieurs hormones sécrétées par le cerveau (GnRH ou *Gonadotropin Releasing Hormone*, LH ou *Luteinizing Hormone*, FSH ou *Follicle Stimulating Hormone*) et par les ovaires (œstradiol). La GnRH, produite dans une partie du cerveau nommée hypothalamus, stimule la production de LH et de FSH dans une glande située à la partie ventrale du cerveau et appelée hypophyse. La LH et la FSH, *via* la circulation sanguine, agissent sur les ovaires pour stimuler la croissance des follicules et assurer la maturation des ovules pour les rendre aptes à la fécondation. Les plus gros follicules présents sur les ovaires produisent de l'œstradiol, hormone qui provoquera un pic de sécrétion de la LH qui induira l'ovulation des follicules matures.

L'augmentation de la sécrétion d'œstradiol, va entraîner l'apparition du comportement œstral (œstrus ou chaleurs). Les chaleurs durent de 24 à 72 heures, pour une moyenne de 36 heures. L'ovulation, qui correspond à la libération des ovules contenus dans les follicules matures, se produit entre 20 et 40 heures après le début des chaleurs, soit vers la fin de celles-ci. Le follicule qui a ovulé se transforme en une structure appelée *corps jaune* qui sécrète la progestérone, hormone bloquant la sécrétion des hormones provenant de l'hypophyse et responsables de la croissance folliculaire. Cette action négative de la progestérone se fait en synergie avec l'œstradiol sécrété par les follicules ovariens. Il y a autant de corps jaunes sur un ovaire qu'il y a de follicules qui ont ovulé. Durant les 14 jours du cycle pendant lesquels le corps jaune est actif (phase lutéale), le développement des follicules est au ralenti et l'ovulation impossible. Si la brebis n'est pas fécondée, le corps jaune dégénère pour permettre une reprise de l'activité ovarienne (phase folliculaire) qui mènera à l'ovulation de nouveaux follicules.

Le taux d'ovulation, qui correspond au nombre d'ovules relâchés à l'ovulation, représente le nombre maximum d'œufs potentiellement fertilisables et constitue, en ce sens, le premier facteur qui limite la taille de la portée.

Une fois expulsé du follicule, l'ovule prendra 3 heures à effectuer le trajet qui le conduira de l'ovaire vers la partie médiane de l'oviducte, le lieu de fécondation (union de l'ovule et du spermatozoïde). Pour les spermatozoïdes, le parcours est beaucoup plus long et dure environ 8 heures. Quelques centaines de spermatozoïdes seulement seront présents dans l'oviducte pour rencontrer l'ovule au moment de la fécondation. Le temps de survie des gamètes dans le tractus génital femelle se situe entre 16 et 24 heures pour l'ovule et entre 30 et 48 heures pour le spermatozoïde. En considérant le moment de l'ovulation, le temps de transport de l'ovule et des spermatozoïdes et le temps de survie des gamètes, il apparaît que c'est vers la fin des chaleurs que les chances de fécondation sont les plus élevées.

La réussite de la fécondation du point de vue physiologique dépend de nombreux facteurs dont le stade de l'œstrus au moment de la saillie, le nombre de spermatozoïdes présents dans le vagin, les anomalies du tractus génital et le synchronisme des mécanismes

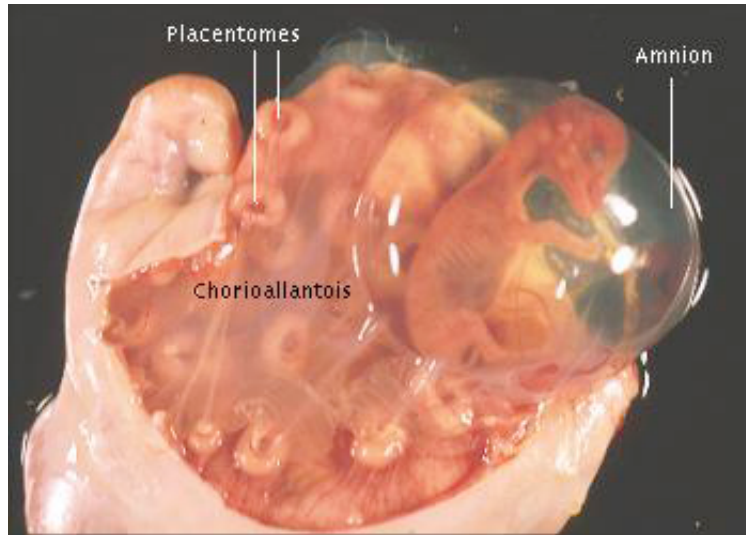


Figure 8 *Fœtus ovin d'environ 60 jours, in situ dans l'utérus maternel ouvert (D'après R. Bowen, 2000)*

Le fœtus, entouré de ses annexes (amnios, chorion, allantoïde), est en contact avec l'endomètre utérin grâce aux placentomes (Caroncules maternels/cotylédons fœtaux) bien visibles sur ce cliché.

physiologiques (concentration des différentes hormones, moment de l'ovulation, etc...).

S'il n'y a pas gestation vers 14 jours après la chaleur, l'utérus produira de la prostaglandine de type F2 α (PGF2 α) qui détruira les corps jaunes et provoquera le début d'un nouveau cycle.

3. Gestation chez la brebis (*Ovis aries*) (Castonguay 2012)

Une fois fertilisé, l'ovule, maintenant devenu embryon, migre vers l'utérus où il demeure libre pour encore un certain temps, soit entre 10 et 20 jours. Les embryons, avant leur implantation définitive dans l'utérus, peuvent migrer d'une corne à l'autre. Lorsqu'il y a plus d'un embryon, leur répartition est normalement égale entre les deux cornes. L'attachement physique de l'embryon à l'utérus, l'implantation, se produit vers le 15^{ème} jour qui suit la fécondation (10-20 jours).

Entre 30 et 90 jours de gestation, les membranes qui entourent le fœtus se développent et s'unissent à la paroi utérine pour constituer le placenta (union des composantes maternelles et fœtales), qui est responsable des échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus (voir *Figure 8*). Finalement, le chorion est la membrane la plus externe qui enveloppe le tout et qui s'attachera à la paroi utérine. L'attachement des membranes fœtales se fait par des excroissances appelées *cotylédons*. L'union d'un cotylédon fœtal et d'une caroncule de l'utérus s'appelle un placentome. Ces structures sont facilement perceptibles lors de l'échographie de gestation. Chaque placentome a un rôle de « pourvoyeur nutritionnel ».

La durée de la gestation est d'environ 145 jours (entre 140 et 150 jours), variant de quelques jours en fonction des races (plus courte chez les prolifiques). La taille de portée influence également la durée de gestation, car les portées simples ont une gestation plus longue que les portées multiples.

4. Survie embryonnaire (Castonguay 2012)

Avant la période d'implantation, dans les premiers 20 jours de gestation, l'embryon est particulièrement sensible à toutes les perturbations extérieures pouvant influencer la mère : changement d'alimentation, stress environnemental, manipulation, traitement etc... C'est pour cette raison qu'il est important d'éviter de stresser inutilement les brebis pendant cette période. Il faut éviter les changements brusques d'alimentation, d'environnement, de conditions climatiques (froid, chaleur, pluie), les traitements divers (tonte, injections, transport) et toutes manipulations inutiles. Même si toutes ces précautions sont suivies à la lettre, environ 20 à 30 % des embryons ne survivront pas. Cette mortalité embryonnaire est attribuable à des anomalies génétiques ou à un milieu utérin défavorable au développement de l'embryon. Les pertes varient avec la race (plus élevées chez les races prolifiques) et augmentent avec le taux d'ovulation et le niveau de stress. La mortalité embryonnaire est également plus élevée chez les brebis en mauvaise condition générale et chez les agnelles (= jeune brebis femelle de moins d'un an).

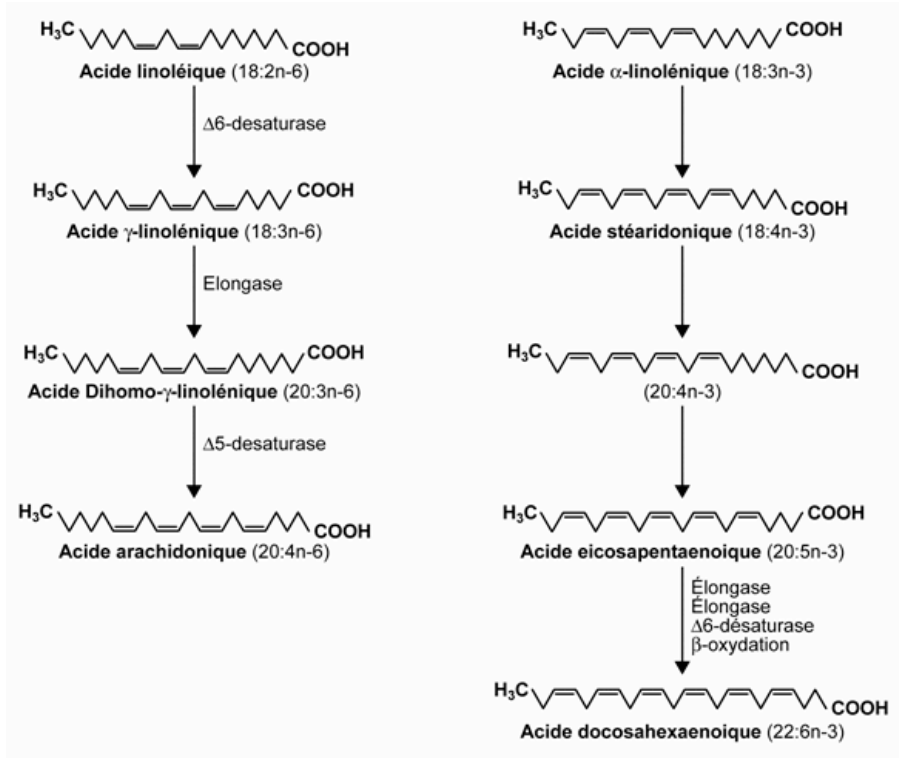


Figure 9 Structure et métabolisme des acides gras ω -3 et ω -6 (Calder 2005)

II- Médiation lipidique et gestation

La maîtrise de la reproduction des animaux d'élevage passe par une connaissance des phénomènes moléculaires associés à la mise en place de la gestation pour un maintien et un développement pérenne de l'embryon *in utero*. Les interactions moléculaires et cellulaires entre embryon et utérus maternel sont de diverses natures. Dans ce domaine, la médiation lipidique, lors d'un tel événement, reste un phénomène très important.

Les médiateurs lipidiques sont issus de la conversion enzymatique d'un certain nombre d'acides gras polyinsaturés des séries oméga-3 et oméga-6 tels que l'acide arachidonique ou l'acide docosahexaénoïque. Ces médiateurs lipidiques, principalement étudiés dans les processus inflammatoires et néoplasiques (Ackermann *et al.*, 2016), jouent également un rôle important dans la physiologie de l'utérus et le développement du conceptus au cours de l'implantation embryonnaire (Woclawek-Potocka *et al.*, 2014) (Ribeiro *et al.*, 2016).

1. Les acides gras

Les acides gras sont classés en 3 catégories, selon la longueur de la chaîne carbonée :

- AGS : Les acides gras saturés (6 et 10 atomes de carbone).
- AGMI : Les acides gras mono-insaturés (12 à 14 atomes de carbone).
- AGPI : Les acides gras polyinsaturés (16 ou plus de 16 atomes de carbone).

Les AG polyinsaturés (AGPI) sont souvent appelés « acides gras essentiels » (AGE) car ces AGE doivent être apportés par l'alimentation. En effet, le corps ne peut pas les synthétiser / fabriquer, ou alors, le corps a des difficultés pour le faire dans certains cas (transformation *via* élongation).

Il existe 2 groupes d'acides gras polyinsaturés (Marventano *et al.*, 2015) : oméga-3 et oméga-6 (voir *Figure 9*).

*** La famille oméga-3 (souvent abrégés ω 3 ou n-3)**

Le chef de file de la famille oméga-3 est l'ALA (l'acide alpha-linolénique)

On dit qu'il est le précurseur des acides gras dérivés, il sera transformé *via* les enzymes (désaturase et élongase).

Les trois principaux acides gras oméga-3 sont :

ALA : L'acide alpha-linolénique C18:3

EPA : L'acide éicosapentaénoïque C20:5

DHA : L'acide docosahexaénoïque C22:6

*** La famille oméga-6 (ω 6 ou n-6)**

Le principal Oméga 6 est l'acide linoléique (LA). Les autres principaux Oméga 6 sont l'acide Gamma-Linolénique (AGL) et surtout l'acide arachidonique (AA), celui-là même que nous trouvons dans l'huile d'arachide.

Les membres de la famille Oméga-6 sont souvent abrégés ω 6 ou n-6.

AL : Acide linoléique C18:2

GLA : Acide gamma-linolénique C18:2

AA : Acide arachidonique C20:4

Arachidonic Acid

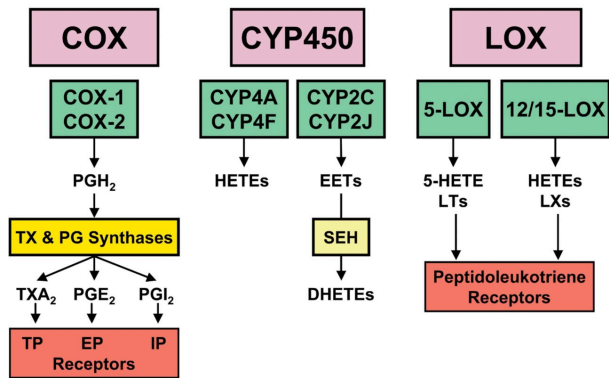


Figure 10 Voies de métabolisme de l'acide arachidonique (Imig 2006)

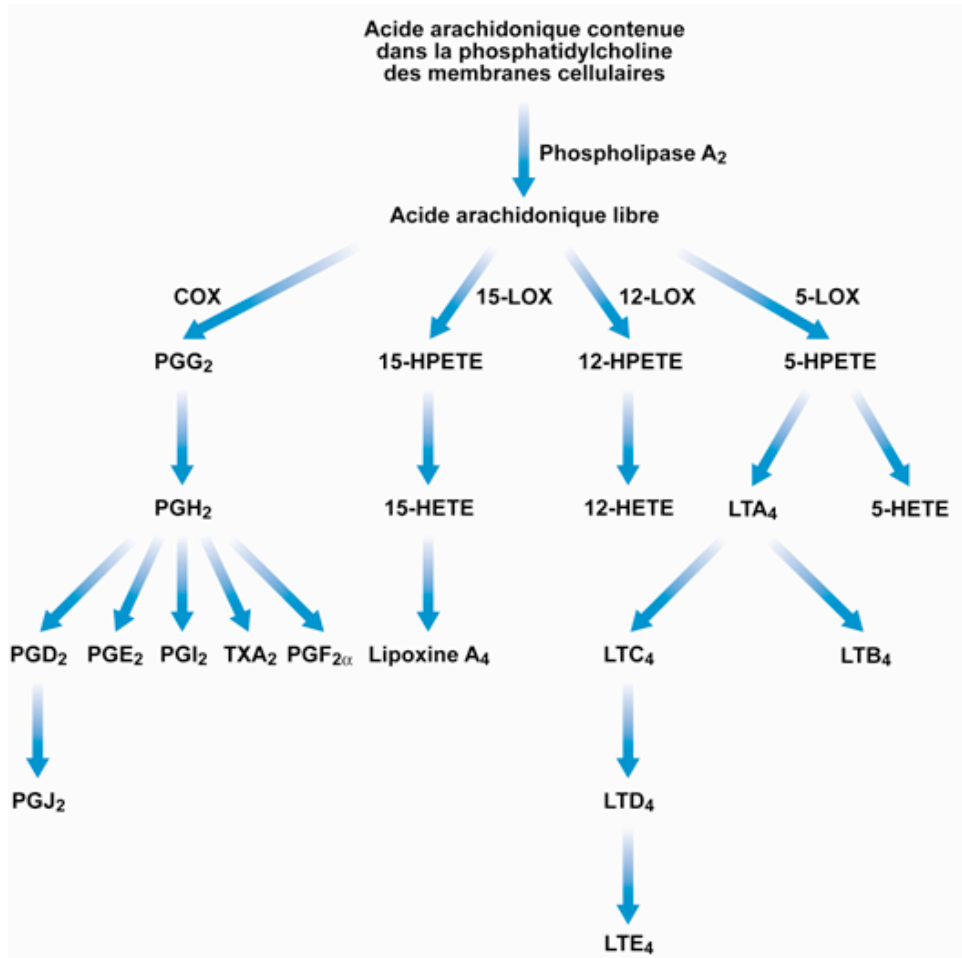


Figure 11 Production d'éicosanoïdes bioactifs via le métabolisme de l'acide arachidonique (AA) par les voies des lipoxygénases et des cyclooxygénases (Calder 2005)

2. Un cas particulier : l'acide arachidonique (AA)

L'acide arachidonique est fabriqué dans notre organisme à partir de l'acide linoléique (LA) : Il n'est donc pas indispensable que cet acide gras soit fourni par l'alimentation. C'est un acide gras à 20 atomes de carbone et 4 doubles liaisons (on le note 20:4 (n-6)). L'acide arachidonique est produit à partir des phospholipides membranaires (phosphatidylcholine) sous l'action des phospholipases A2 ou C.

Précurseur direct des éicosanoïdes (acides gras à très longue chaîne), l'acide arachidonique est un acide gras essentiel. Cette molécule est au "carrefour" de différentes voies métaboliques aboutissant à la synthèse de plusieurs groupes d'éicosanoïdes (Chandrasekharan *et al.*, 2016). Ces éicosanoïdes représentent donc une famille de lipides bioactifs qui contiennent 20 atomes de carbones (*eico* en grec). Ils sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique grâce aux activités initiales des cyclooxygénases (Isoformes COX1, COX2), ou des lipoxygénases, mais également *via* des réactions enzymatiques à partir des produits intermédiaires formés. Plus précisément, l'acide arachidonique peut être métabolisé *via* trois voies majeures : la voie des Cyclo-oxygénases (COXs), celle des lipoxygénases (LOXs) et la voie des Epoxygénases/Hydroxylases (Cytochrome P450) (voir *Figure 10*). Les éicosanoïdes, alors obtenus, sont classés en fonction de l'une des voies enzymatiques possibles :

* Les prostanoïdes : issus de l'acide arachidonique par action des cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2). Il existe au moins 16 prostaglandines réparties en 9 classes de PGA à PGI. Contrairement aux leucotriènes, elles n'ont conservé que 2 doubles liaisons (c'est pourquoi le chiffre 2 est retrouvé dans leur nomenclature). La COX transforme l'AA en PGG2 puis en PGH2. Selon le type cellulaire et la nature de la stimulation, la PGH2 conduit à 5 produits (PGE2, PGD2, PGF2, PGI2 ou prostacycline, TXA2 ou Thromboxane A2).

* Les HETEs (acides HydroxyEicosaTétraEnoïques), les leucotriènes (LTs) et les lipoxines (LXs) : issus de l'acide arachidonique par la voie des lipoxygénases et/ou des époxygénases (CYP450).

- Nous consacrons un paragraphe particulier pour les lipoxygénases et la synthèse des HETEs ci-après.

- Les leucotriènes sont issus de l'acide arachidonique par la voie de la 5-lipoxygénase. Ils sont nommés ainsi car ils ont été découverts dans des leucocytes et que ce sont des lipides insaturés à 3 doubles liaisons conjuguées (triènes) et 20 atomes de carbone.

LTA4 et LTB4 sont exclusivement lipidiques. LTC4, LTD4 et LTE4 sont des peptido-leucotriènes ou des leucotriènes sulfidopeptidiques (Cys-LT). Ils sont libérés à travers la membrane cellulaire par mise en jeu d'un transporteur spécifique. Ils sont synthétisés par les polynucléaires mais surtout par les mastocytes et macrophages. Certains leucotriènes interviennent dans le chimiotactisme et l'activation des phagocytes (LTB4), ou encore l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la constriction des muscles lisses du tract respiratoire (LTC4). Les leucotriènes sont des médiateurs critiques des réactions inflammatoires observées dans l'allergie, l'asthme et l'arthrite.

- Les lipoxines jouent le rôle de véritables antagonistes naturels de la réponse inflammatoire. Elles sont de puissants régulateurs des fonctions des leucocytes (migration, dégranulation, phagocytose et régulation de la formation de médiateurs pro-inflammatoires).

Elles induisent un signal d'arrêt du recrutement des cellules au locus inflammatoire et permettent ainsi la clairance de ces dernières. Les lipoxines agissent en abaissant ou en contrebalançant la formation et l'action des médiateurs inflammatoires. Elles proviennent d'un métabolisme transcellulaire de l'acide arachidonique qui implique plusieurs lipoxygénases (LOX), notamment la 12/15-LOX et la 5-LOX. Ces enzymes qui s'expriment au niveau de différents types cellulaires (monocytes, macrophages, cellules épithéliales) sont contrôlés par des cytokines comme l'IL-4 et l'IL-13. Elles produisent un dérivé, le 5(6)-époxytétraène qui sera ensuite métabolisé en lipoxine A4 (LXA4) ou en lipoxine B4 (LXB4) par une hydrolase. Ainsi, les métabolites de l'acide arachidonique (ou lipoxygénés) sont des effecteurs physiologiques puissants dans une variété de réponses cellulaires.

Tableaux 1a et 1b Gènes codant pour les lipoxygénases chez 3 espèces de mammifères (2 Ruminants, Brebis et Vache, 1 murin, Souris) (D'après la base de données Ensembl Project).

Espèce ruminante			Gène	Souris (Mus musculus)
Gène	Brebis (Ovis aries)	Vache (Bos taurus)		
ALOXE3	Chr 11	Chr 19	Aloxe3	Chr 11
ALOX5	Chr 25	Chr 28	Alox5	Chr 6
ALOX12	Chr 11	Chr 19	Alox8	Chr 11
ALOX12B	Chr 11	Chr 19	Alox12	Chr 11
ALOX15	Chr 11	Chr 19	Alox12b	Chr 11
ALOX15B	Chr 11	Chr 19	Alox12e	Chr 11
			Alox15	Chr 11

La majorité des gènes codant pour les lipoxygénases E3, 5, 12, 12B et 15 se trouvent dans le même cluster (sur le même chromosome) pour chacune des espèces mentionnées. Les gènes ovins et murins sont situés en majorité sur le Chromosome 11, ceux de la vache sur le chromosome 19.

Seul le gène codant pour l'isoforme 5-lipoxygénase dans les 3 espèces est situé sur un chromosome différent au sein de chaque espèce.

Il existe un gène *ALOX15B* chez les ruminants, inexistant chez le murin. Chez la souris, il est trouvé un gène *Alox8* et un gène *Alox12e*, inexistants chez les ruminants.

Tableau 2 Famille des gènes spécifiques des lipoxygénases humaines et murines (Kuhn et al. 2015)

Human ALOX genes and major expression sites of the corresponding LOX-isoforms.

Human gene	Former name	Mouse gene	Former name	Major expression
ALOX15	12/15-LOX	alox15	Lc12-LOX ^a	Eosinophils, bronchial epithelium
ALOX15B	15-LOX2	alox15b	8-LOX	Hair roots, skin, prostate
ALOX12	pl12-LOX ^b	alox12	pl12-LOX	Thrombocytes, skin
ALOX12B	12R-LOX	alox12b	12R-LOX	Skin
ALOXE3	eLOX3	aloxe3	eLOX3	Skin
ALOX5	5-LOX	alox5	alox5	Leukocytes, macrophages, dendritic cells
Pseudogene		alox12e	elox12	Skin

^a lc – leukocyte-type.

^b pl – platelet-type.

Chaque gène de la famille des lipoxygénases est indiqué avec son nom actuel et son ancienne dénomination pour les deux espèces (humain, souris). La localisation tissulaire de chacune des enzymes est mentionnée dans la dernière colonne de ce tableau.

Remarque : Attention, la convention d'écriture des gènes humains et murins n'est pas respectée ici.

3. Les lipoxygénases

Chez les mammifères, l'acide linoléique et l'acide arachidonique restent les acides gras polyinsaturés les plus abondants servant de substrats pour les diverses isoformes de Lipoxygénases. Les lipoxygénases (LOX) sont des enzymes à fer non hémique présentes chez tous les eucaryotes et les procaryotes. Elles catalysent l'oxydation des acides gras libres insaturés en hydroperoxydes qui sont oxydés par de nombreuses enzymes pour générer divers métabolites.

Les lipoxygénases forment une classe d'enzymes de peroxydation hétérogène, impliquées non seulement dans la prolifération et la différenciation cellulaires, mais également à l'origine de bon nombre de pathologies humaines. Les lipoxygénases jouent un rôle clé dans l'homéostasie d'oxydo-réduction cellulaire, élément important de la régulation de l'expression génique (Buelna-Chontal *et al.*, 2013). Les premières lipoxygénases de mammifères ont été découvertes il y a une quarantaine d'années. Elles ont été bien décrites d'un point de vue structural et vis-à-vis de leurs propriétés fonctionnelles. Cependant, le rôle biologique des différentes isoformes n'est pas complètement élucidé.

Les lipoxygénases représentent un groupe de dioxygénases catalysant l'insertion d'une molécule d'oxygène au sein des acides gras polyinsaturés (ou AGPI) tels que l'acide arachidonique sur le carbone en position 5, 12 ou 15 (respectivement par la 5-LOX, la 12-LOX et la 15-LOX). Elles transforment ainsi l'acide arachidonique en dérivés hydroperoxydés, qui seront à leur tour transformés en médiateurs lipidiques bioactifs (éicosanoïdes et produits dérivés) tels que les leucotriènes, lipoxines, hépoxilines, éoxines, résolvines, protectines et autres dérivés issus d'AA, EPA et DHA (voir *figures i11 et i11 Bis*). Les lipoxygénases sont retrouvées de façon ubiquitaire chez les eucaryotes (plantes, mammifères).

Les lipoxygénases jouent un rôle important dans la signalisation pour les processus de défense et de réparation tissulaire chez les plantes, alors que chez les mammifères, elles sont impliquées dans l'inflammation, l'asthme et les pathologies cardiaques.

3.1. Classification des lipoxygénases chez les mammifères

Le génome humain comprend six gènes fonctionnels spécifiques codant pour 6 isoformes de lipoxygénases : *ALOXE3*, *ALOX5*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX15* et *ALOX15B*. L'ensemble de ces gènes appartiennent tous à un cluster situé sur le même chromosome pour les différentes espèces : 17 (humain), 11 (brebis), 19 (vache) ou encore 11 (souris). Seul le gène de la 5-Lipoxygénase (*ALOX5*) se situe sur un chromosome différent des autres gènes de Lipoxygénases au sein de chacune des espèces citées : 10 (humain), 25 (brebis), 28 (vache) ou encore 6 (souris) (voir *Tableaux 1a et 1b*, positionnement des gènes de LOXs entre brebis, vache et souris).

A l'origine, les diverses isoformes humaines de lipoxygénases étaient classées en regard de leur activité (positionnement concerné de l'atome d'oxygène sur une double-liaison de l'acide arachidonique). Désormais, la nomenclature des gènes est fréquemment employée pour définir chaque membre de la famille des LOXs (voir *Tableau 2*).

La convention d'écriture "Gène, ARN/ADNc et Protéine" pour les ruminants et l'humain est la même. Celle concernant les espèces murines est différente. Néanmoins, les deux conventions respectent les règles internationales (voir la nomenclature utilisée indiquée en début de ce mémoire).

La comparaison des séquences d'acides aminés entre les membres de la famille des LOXs permet de constater que les activités respectives des enzymes ne sont pas toujours corrélées à leurs séquences.

Ainsi, entre les espèces humaine et murine, il existe des différences quant aux activités enzymatiques des protéines LOX identifiées (voir *Tableau 2*).

Chez l'humain,

- Le gène *ALOX15* code pour une 12/15 lipoxygénase, soit une enzyme à activité 12-LOX et activité 15-LOX, retrouvée dans les leucocytes éosinophiles, les cellules épithéliales broncho-alvéolaires et les monocytes (traités à l'Interleukine 4),
- Le gène *ALOX15B* code pour une 15-LOX2 dans les cellules épithéliales,
- Le gène *ALOX12* code pour une 12-lipoxygénase de "type plaquettaire" en, raison de son fort taux d'expression au sein de ces cellules sanguines, et que l'on retrouve dans la peau,
- Les gènes *ALOX12B* et *ALOXE3* code chacun pour deux formes de LOXs de type épidermal, co-exprimées dans la peau, *ALOX12B* codant pour une 12R-LOX. Ces enzymes sont impliquées dans la différenciation épidermale et semblent importante pour le développement de la barrière cutanée.
- Enfin, le gène *ALOX5* code pour une 5-Lipoxygénase, dont le rôle est majeur dans la biosynthèse des leucotriènes.

Chez la souris,

- Les gènes *Aloxe3*, *Alox5*, *Alox12* et *Alox12b* codent pour des enzymes dont les séquences en acides aminés sont conservées en grande partie par comparaison aux orthologues humains. Ces protéines montrent des propriétés enzymatiques similaires.
- En revanche, pour les gènes *alox15* et *alox15b*, le cas est différent.
- Le gène *Alox15* code pour une enzyme à activité 12-lipoxygénase (l'espèce humaine présente une activité 15-lipoxygénase). La 15-LOX est également appelée "12-LOX de type leucocytaire" en raison de sa présence en grande quantité dans les globules blancs. Elle devrait être classée comme "Alox15 à activité 12-lipoxygénase". Ce cas est retrouvé chez bon nombre de mammifères dont le rat, le porc, la vache ou encore le macaque. L'analyse des génomes complets séquencés de ces espèces n'a pas permis de mettre en évidence l'existence simultanée de gènes *Alox15* et *Alox12* de type leucocytaire au sein de la même espèce de mammifère. Ainsi, le lapin, espèce chez laquelle des variants *ALOX15* à activité 12-LOX et *ALOX15* à activité 15-LOX sont exprimés, une seule copie du gène *ALOX15* existe (Berger *et al.*, 1998). Une modification post-traductionnelle pourrait être à l'origine de l'existence des deux isoformes enzymatiques (Baranov *et al.*, 2002). La même observation est valable dans l'espèce humaine. Des études de mutagenèse dirigée chez cette dernière ont montré que le changement d'un seul acide aminé ciblé a permis de convertir une forme *ALOX15* à activité 15-lipoxygénase en *ALOX15* à activité 12-lipoxygénase (Sloane *et al.*, 1991; Ivanov *et al.* 2010). De façon similaire, chez la souris, ce phénomène peut être observé par conversion d'une forme *ALOX15* à activité 12-lipoxygénase en *ALOX15* à activité 15-lipoxygénase (Borngräber *et al.*, 1996).
- Le gène *Alox15b* code pour une forme à activité 8-S-lipoxygénase (Jisaka *et al.*, 1997), alors que l'enzyme humaine *ALOX15B*, avec laquelle l'orthologue murin partage une grande similarité de séquence d'acides aminés, possède une activité purement 15-lipoxygénase (Brash *et al.*, 1997).

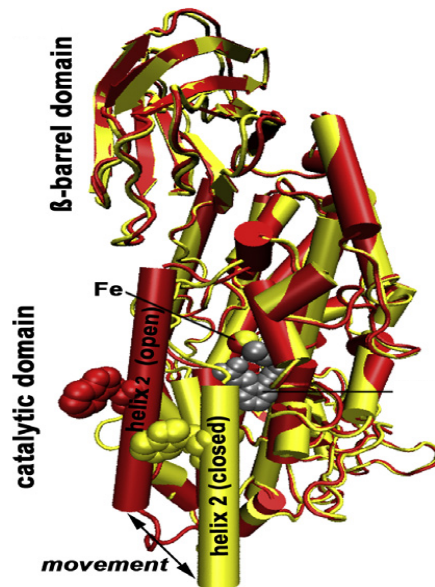


Figure 12 Représentation schématique de la protéine 12/15-lipoxygénase de lapin (Ivanov et al., 2010)

La structure ouverte sans ligand est indiquée en rouge, la structure fermée de liaison au ligand est en jaune. Le noyau ferreux du site catalytique est visible en gris. Les hélices 2 interviennent dans la liaison de l'enzyme à la membrane cellulaire.

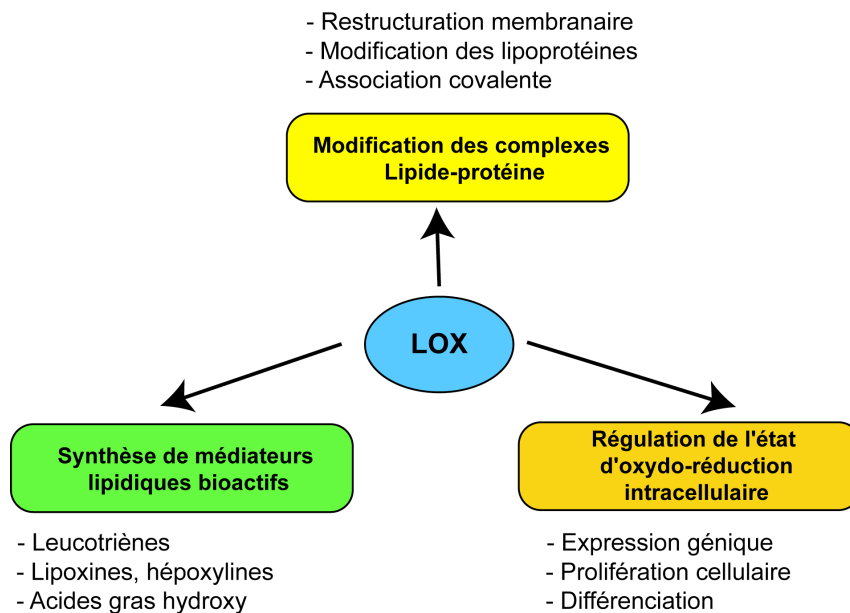


Figure 13 Fonctions biologiques des lipoxygénases (Kuhn et al., 2015)

Les lipoxygénases pourraient démontrer une fonctionnalité biologique selon trois scénarios possibles : par la formation de médiateurs lipidiques bioactifs, par la modification structurelle d'assemblages complexes "lipide-protéine", par la modification de l'homéostasie cellulaire (oxydo-réduction).

3.2. Structure moléculaire des lipoxygénases de mammifères

La structure complète de diverses lipoxygénases d'origine végétale ou animale a pu être définie grâce à des études de cristallographie et de rayonnement X au début des années 1990. La plupart des lipoxygénases sont de simples chaînes polypeptidiques structurées en deux domaines (voir *Figure 12*) (Ivanov *et al.* 2010) (Hemak *et al.*, 2002):

- Un domaine court en tonneau, à chaînes anti-parallèles, en feuillets β , dans la partie N-terminale, domaine impliqué dans la fixation à la membrane cellulaire grâce aux interactions protéine/protéine ou protéine/lipide membranaires, calcium dépendantes (Bateman *et al.*, 1999) (Gillmor *et al.*, 1997).

- Un long domaine en hélice avec site catalytique, dans la partie C-terminale.

Le fort taux de conservation de la structure en deux domaines des Lipoxygénases suggère un rôle fonctionnel de la partie N-terminale à structure en tonneau.

Le domaine court intervient dans la fixation de l'enzyme aux lipides membranaires. Des études de mutagenèse dirigée modifiant les tryptophanes exposés en surface engendrent une altération de la fixation de l'enzyme à la membrane de la cellule (Kulkarni *et al.*, 2002).

Le domaine long C-terminal contient le site de fixation au substrat et le site catalytique. Ce dernier, chez toutes les protéines LOXs, a une structure primaire en hélices α et permet l'ancrage de l'atome de fer non-hème du site catalytique.

3.3. Fonctions biologiques des lipoxygénases de mammifères

Les lipoxygénases sont impliquées dans divers processus cellulaires (Kuhn *et al.* 2015).

Deux concepts peuvent expliquer le fonctionnement de ces enzymes (voir *Figure 13*) :

- Plusieurs lipoxygénases sont capables d'oxyder des complexes d'esters lipidiques voire des assemblages "lipide-protéine" (biomembranes, lipoprotéines) par modification de leur conformation. Ce concept est en partie applicable au rôle de diverses protéines sur l'érythropoïèse, la différenciation épidermale et l'athérogenèse.

- Les lipoxygénases représentent des enzymes de peroxydation. En formant des peroxydes lipidiques, elles modifient l'état d'oxydo-réduction de la cellule. Puisque l'équilibre d'oxydo-réduction de la cellule est un important facteur régulateur de la prolifération cellulaire et de l'expression de gènes, l'activité des LOXs intracellulaires pourrait avoir un impact sur la fonctionnalité cellulaire. L'activité catalytique des LOXs contribue clairement à l'homéostasie cellulaire.

Grâce à leur activité, les lipoxygénases interviennent dans divers processus biologiques.

C'est ainsi que :

- ALOX15 intervient dans la dégradation des mitochondries pendant l'érythropoïèse, en causant des dommages à la membrane mitochondriale, permettant ainsi aux inhibiteurs de la respiration oxydative de pénétrer à l'intérieur (Schewe *et al.*, 1977).

- ALOX12B et ALOXE3 sont impliquées dans la différenciation tardive de l'épiderme, en particulier dans la maintenance de la couche cornée, et dans le développement cutané (Krieg *et al.*, 2013) (Krieg *et al.*, 2014).

- Certaines LOXs jouent un rôle dans la prolifération cellulaire. Ainsi, les métabolites d'ALOX5 (5-HETE, 5-oxo-EETE et peptido-leucotriènes) stimulent la prolifération cellulaire et pourraient agir en tant qu'agents pro-carcinogènes. De même, le 12-HETE, métabolite issu de l'activité d'ALOX12, ALOX12B, ALOX15 montrent une activité pro-carcinogène en stimulant l'adhésion cellulaire, la formation de métastases et l'angiogenèse. Néanmoins, la production des différentes LOXs n'est pas régulée de la même façon dans tous les types de tumeurs malignes. Elle dépend également de la taille de la tumeur et de son stade de développement.

- Les lipoxigénases peuvent jouer un rôle dans l'inflammation. Certaines engendrent des réponses pro-inflammatoires. Les leucotriènes, métabolites issus de l'activité d'Alox5, interviennent ainsi en tant qu'agents pro-inflammatoires. Ces métabolites sont connus dans le cadre de pathologies telles que l'asthme. Certains stimulent la réponse immunitaire innée (chimiotaxie, agrégation cellulaire des leucocytes) et augmentent la perméabilité du réseau vasculaire aux cellules immunitaires.

D'autres LOXs interviennent dans les réponses anti-inflammatoires (synthèse de résolvines et protectines). Certains dérivés lipoxigénés activeraient la signalisation PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), stimulant ainsi un phénomène anti-inflammatoire.

- Les lipoxigénases et le système cardio-vasculaire.

Certains métabolites d'ALOX15 et ALOX15B interviendraient dans la régulation du tonus vasculaire et pourraient donc jouer un rôle dans la régulation de la pression sanguine et l'hypertension. Ils joueraient également un rôle dans l'athérosclérose (ALOX5, ALOX15, ALOX15B). Les leucotriènes, issus de l'activité d'ALOX5, agissent sur la contractilité vasculaire. De forts taux d'expression du gène *ALOX5* ont été décrits dans les plaques d'athérome pour la protéine correspondante et ses métabolites. ALOX15B, plus particulièrement, jouerait un rôle dans l'athérogenèse.

L'activité d'ALOX12 et d'ALOX15B impacterait la fonction plaquettaire et le phénomène de thrombose artérielle. ALOX12 est présente en grande quantité dans les plaquettes humaines (Hamberg *et al.*, 1974) et diminuerait l'agrégation plaquettaire. A l'inverse, ALOX15B favoriserait ce phénomène et suggérerait son implication dans les thromboses.

- Les lipoxigénases et le système nerveux central.

ALOX15 est la forme majeure présente dans le cerveau de rat (Watanabe *et al.*, 1993) ou de chien (Nishiyama *et al.*, 1992).

Les métabolites 12-HETE et 12-HpETE des lipoxigénases concernées sont impliqués dans le développement cérébral en tant que médiateurs pour l'architecture neuronale et entreraient dans la cascade réactionnelle de la voie de la Sémaphorine 3A (SEMA3A) (Mikule *et al.*, 2002).

Les neurones sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif et certaines pathologies (Accident Vasculaire cérébral, Maladies de Parkinson ou d'Alzheimer) sont corrélées à des niveaux d'expression élevés des gènes *ALOX5* et *ALOX15*. Ainsi, ALOX15 intervient dans l'apoptose neuronale et de fort taux de cette protéine sont observés en cas d'ischémie.

A l'inverse, l'activité de certaines lipoxigénases peut engendrer des métabolites à effet neuroprotecteur (lipoxines, protectines).

- Les lipoxigénases et les maladies métaboliques.

Diabète : Plusieurs enzymes et leurs métabolites sont impliqués dans la pathologie du diabète. Ainsi, le leucotriène LB4 issu de l'activité d'ALOX5 et le 12-HETE provenant de celles d'ALOX12 ou ALOX15 présentent des taux élevés chez les patients diabétiques avec une ischémie cardiaque sévère (Issan *et al.*, 2013).

L'expression du gène *ALOX15* est augmentée dans les cultures de cellules et les modèles animaux de diabètes (Dobrian *et al.*, 2011).

De même, le métabolite 12(S)-HETE induit une diminution de la sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques humains en culture (Ma *et al.*, 2010).

Adipogenèse, obésité et syndrome métabolique : Les gènes *ALOXE3*, *ALOX5*, *ALOX12* et *ALOX15* sont impliqués dans l'adipogenèse.

Le 15-HETE, métabolite issu de l'activité d'ALOX15 et ALOX15B, induit la croissance et l'angiogenèse du tissu adipeux (Soumya *et al.*, 2013).

III- Contexte et projet de recherche

1. Contexte et résultats préliminaires

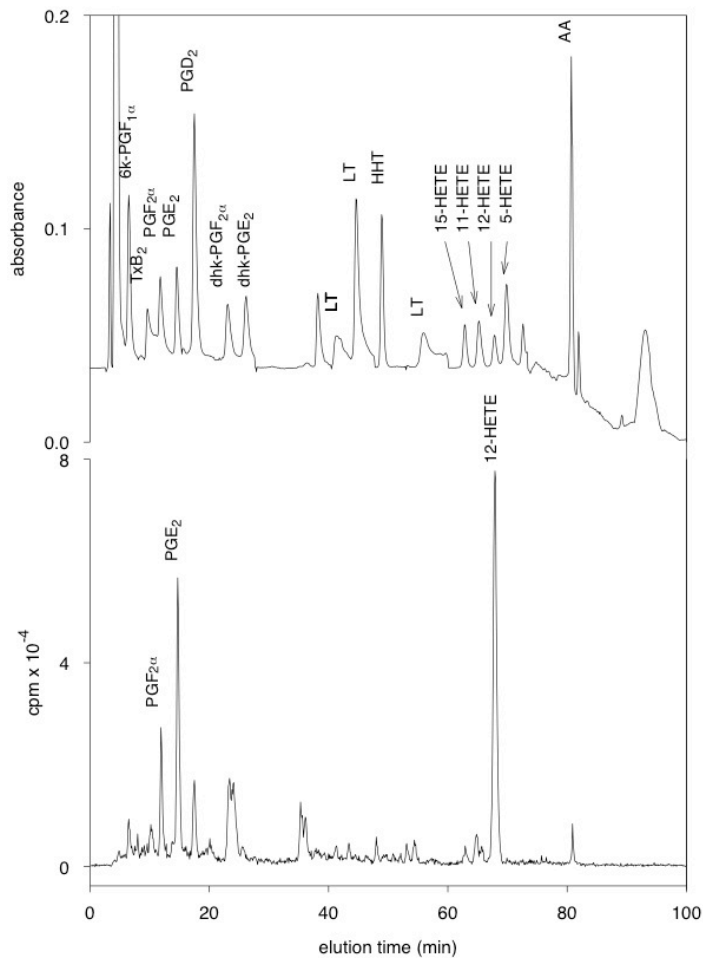
Le projet de recherche qui fait l'objet de ce mémoire trouve ses origines dans les premiers travaux concernant les investigations sur les molécules impliquées dans les interactions entre l'organisme maternel et l'embryon au moment de l'implantation. Il s'inclut dans des recherches qui s'intéressent particulièrement aux médiateurs lipidiques d'origine utérine et embryonnaire au cours de la mise en place de la gestation chez les espèces ruminantes (brebis, vache). Ces recherches portent sur la période de la gestation qui s'étend de l'éclosion du blastocyste à la période péri-implantatoire. Ils s'appuient essentiellement sur les animaux d'élevage (espèces bovine et ovine) tout en incluant d'autres espèces de mammifères (lapin, rongeur). Les travaux menés consistent à explorer et comprendre le rôle fonctionnel des médiateurs lipidiques dans le jeu d'interactions entre les tissus somatiques de l'organisme maternel et l'embryon en développement. Ces molécules sont issues des acides gras polyinsaturés (omega-3 et omega-6). Ces médiateurs sont des acteurs essentiels de la régulation des premiers stades du développement embryonnaire et de la physiologie utérine au moment de l'établissement de la gestation (Charpigny *et al.*, 1997a; Charpigny *et al.*, 1997b).

Certaines de ces molécules de nature lipidique trouvent leurs origines dans le métabolisme de l'acide arachidonique issu des phospholipides membranaires des cellules. Comme nous l'avons vu précédemment, l'une des voies de ce métabolisme est la voie des cyclooxygénés (via les enzymes cyclooxygénases 1 & 2). Celle-ci aboutit à la formation des prostanoides (prostaglandines, thromboxanes, HHT ou acides Hydroxy-HeptadécaTriénoïques). Néanmoins, l'acide arachidonique peut suivre d'autres voies de conversion enzymatique en métabolites (voie des lipoxygénés, voie mineure du cytochrome P450), celle à laquelle nous nous intéressons concerne les lipoxygénés, pour le projet mené ici.

Au cours d'études d'identification des produits issus de la voie des cyclooxygénés (par analyses chromatographiques), certains résultats nous ont amené à nous intéresser aux processus biochimiques d'obtention des lipoxygénés.

Les objectifs de la phase préliminaire du projet ont été déclinés en 3 points :

- Déterminer la capacité de l'utérus ovin à produire des métabolites lipoxygénés de l'acide arachidonique,
- Examiner le niveau d'expression du gène codant pour la 12-lipoxygénase au sein de ce tissu, en terme de transcrits,
- D'analyser la régulation des transcrits de la 12-lipoxygénase pendant le cycle œstral et la gestation précoce.



(Analyses HPLC de G. Charpigny - UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France)

Figure 14 Séparation chromatographique (HPLC Phase inverse) des éicosanoïdes produits par l'épithélium luminal d'endomètre ovin à 14 jours du cycle œstral

- ✓ Détection par absorbance en UV d'un mélange de solutions standards correspondant aux principaux éicosanoïdes stables issus du métabolisme de l'acide arachidonique annoté AA (Partie haute du chromatogramme).
Ce mélange est composé de prostaglandines et de leurs dérivés issus de la voie des cyclooxygénases (6 keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, PGE₂, dhk-PGF_{2α} ou 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ alpha, PGD₂, dhk-PGE₂ ou 13,14-dihydro-15-céto PGE₂), TxB₂ ou Thromboxane B₂, HHT ou Acide Hydroxy-Heptadécatriénoïque), de Leucotriènes (LT) issus de la voie de la 5-Lipoxygénase (Mélange LTA₄, LTB₄, LTC₄ et LTD₄), d'acides Hydroxy-EicosaTétraÉnoïques issus de l'activité des 4 principales lipoxygénases respectives (5-HETE, 11-HETE, 12-HETE et 15-HETE).
- ✓ Détection radioactive d'un milieu de culture de cellules épithéliales lumorales d'endomètre ovin en présence d'Acide arachidonique tritié (Partie basse du chromatogramme).

1.1. Identification des métabolites de l'acide arachidonique produits par l'endomètre ovin

Un dosage, par Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase inverse, d'un extrait de cellules luminales (à 14 jours du cycle œstral) incubé en présence d'acide arachidonique marqué au tritium a révélé une production de plusieurs écosanoïdes (voir *Figure 15*).

3 principaux métabolites radioactifs ont pu être détectés après incubation de cellules épithéliales luminales d'endomètre : 2 prostanoïdes (PGF_{2α}, PGE₂), 1 dérivé lipoxycéne (12-HETE), ce dernier reste le composé majoritaire présent dans le milieu (1,3 fois plus que la PGE₂ et 2,7 fois plus que la PGF_{2α}).

Ce dernier métabolite est issu de l'activité enzymatique de l'enzyme 12-lipoxygénase présente dans les cellules épithéliales utilisées. L'acide 12-(S)-hydroxy 5,8,10,14-éicosatétraénoïque (12-(S)-HETE) est un produit final de l'acide arachidonique majeur synthétisé par l'endomètre ovin.

Le fait que ce métabolite soit présent dans une proportion si élevée par comparaison aux prostaglandines nous amène à nous poser les questions suivantes :

La quantité importante de 12-HETE produite signe-t-elle une quantité importante d'enzyme 12-lipoxygénase utérine?

Quel est le rôle physiologique de la 12-lipoxygénase et de son métabolite 12-HETE au sein de l'endomètre utérin de brebis ?

Cette enzyme a été décrite jusqu'ici chez les mammifères lors d'étude de physiopathologies comme nous l'avons vu au début de ce mémoire, en particulier dans l'espèce humaine (barrières épithéliales, inflammation, asthme, diabète, cancer...), mais aucune information relatant sa présence dans l'utérus de ruminants n'a jamais été rapportée. En cela, les résultats préliminaires que nous avons menés trouvent leur originalité.

Des travaux complémentaires ont été effectués au laboratoire afin de mieux caractériser l'enzyme 12-lipoxygénase au sein du tissu utérin :

- ✓ Recherche du type d'enzyme 12-lipoxygénase (plaquettaire, leucocytaire),
- ✓ Localisation des ARN messagers spécifiques dans l'endomètre,
- ✓ Cinétique d'expression des transcrits alox12 au cours du cycle œstral et en début de gestation.

1.2. Caractérisation de la 12-lipoxygénase d'endomètre ovin : Mise en évidence et Analyse par RT-PCR

Lors des premiers travaux de recherche au laboratoire, les lipoxygénases ovines n'étaient pas renseignées dans les banques de séquences. Plus généralement, **il n'existait que très peu d'informations de séquences relatives aux ovins**. Seules étaient disponibles quelques informations de séquences bovines, à partir desquelles ce travail a pu débuter, **puisque'il existe une très forte homologie génétique et chromosomique entre les trois espèces de ruminants d'élevage (brebis, vache et chèvre)** (Leveziel *et al.*, 2000).

La classification originelle des 12-lipoxygénases n'était, malgré tout, pas très bien définie dans l'espèce bovine. Le nom attribué à chacun des 2 types était lié au tissu dans lequel chacune des formes avait été trouvée :

- 12-lipoxygénase de type plaquettaire ou cornéenne (retrouvée dans les plaquettes et la cornée)
- 12-lipoxygénase de type leucocytaire ou trachéale (retrouvée dans les leucocytes et la trachée).

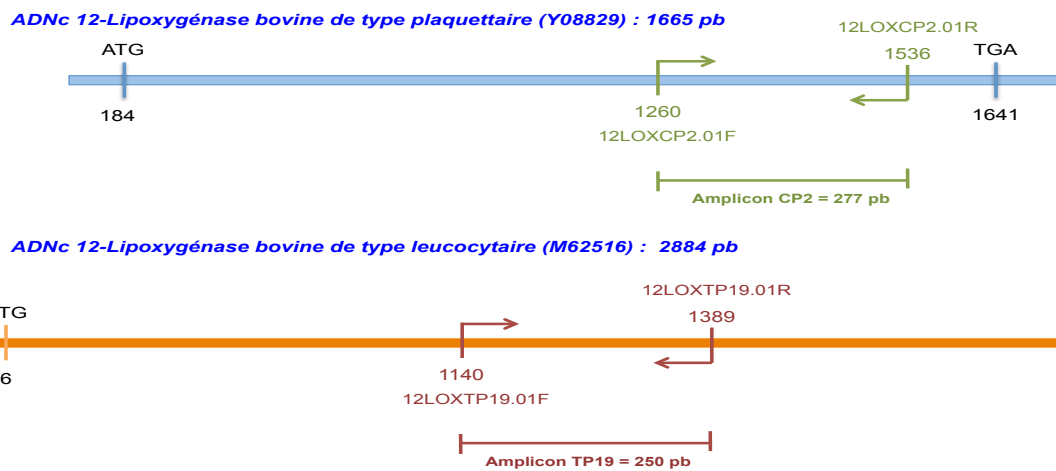


Figure 15 Positions des amorces oligonucléotidiques sur les séquences ADNc bovines correspondant aux 2 types de 12-lipoxygénases (plaquettaire, leucocytaire)

Les deux séquences (Y08829 et M62516) correspondent à deux ADNc issus de 2 gènes distincts

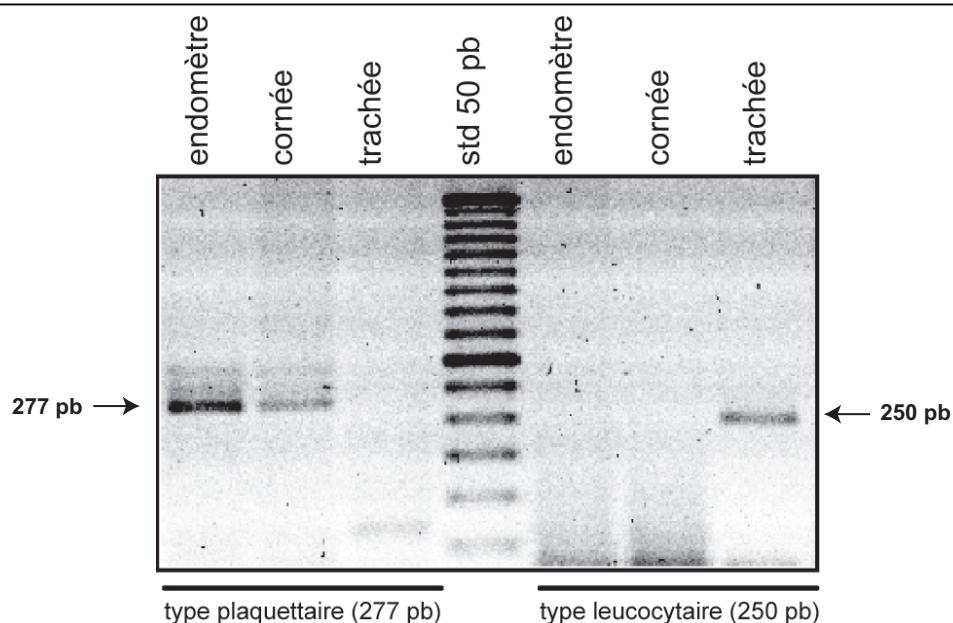


Figure 16 Recherche par RT-PCR des transcrits de la 12-lipoxygénase exprimés par les cellules épithéliales d'endomètre utérin ovin. Détermination du type de 12-LOX.

Expression des transcrits de la 12-lipoxygénase endométriale par comparaison à des ARNm issus de 2 types de tissus ovins de nature épithéliale (cornée, trachée). Le couple d'amorces "12LOXCP2.01" a été utilisé pour la recherche du type plaquettaire (ou cornéen) et le couple d'amorces "TP19.01" pour la recherche du type leucocytaire (ou trachéal).

Le gène alox12 de type "plaquettaire" (cornéen) est exprimé dans l'endomètre ovin.

Dessiner des amorces sur les séquences bovines disponibles a permis néanmoins la transposition rapide à l'espèce ovine. Une recherche des transcrits de la 12-lipoxygénase a été menée par RT-PCR dans des tissus ovins afin de déterminer le type de lipoxygénase présente dans l'endomètre utérin ovin. Des amorces oligonucléotidiques spécifiques de chaque type (12LOXCP2.01F/R pour la forme plaquettaire, 12LOXTP19.01F/R pour la forme leucocytaire) ont été dessinées à partir des séquences codantes disponibles des ARN messagers bovins respectifs (voir *Tableau 3 et Figure 15*).

Tableau 3. Amorces oligonucléotidiques spécifiques des ADNc des 2 types de 12-lipoxygénases identifiés chez l'espèce bovine

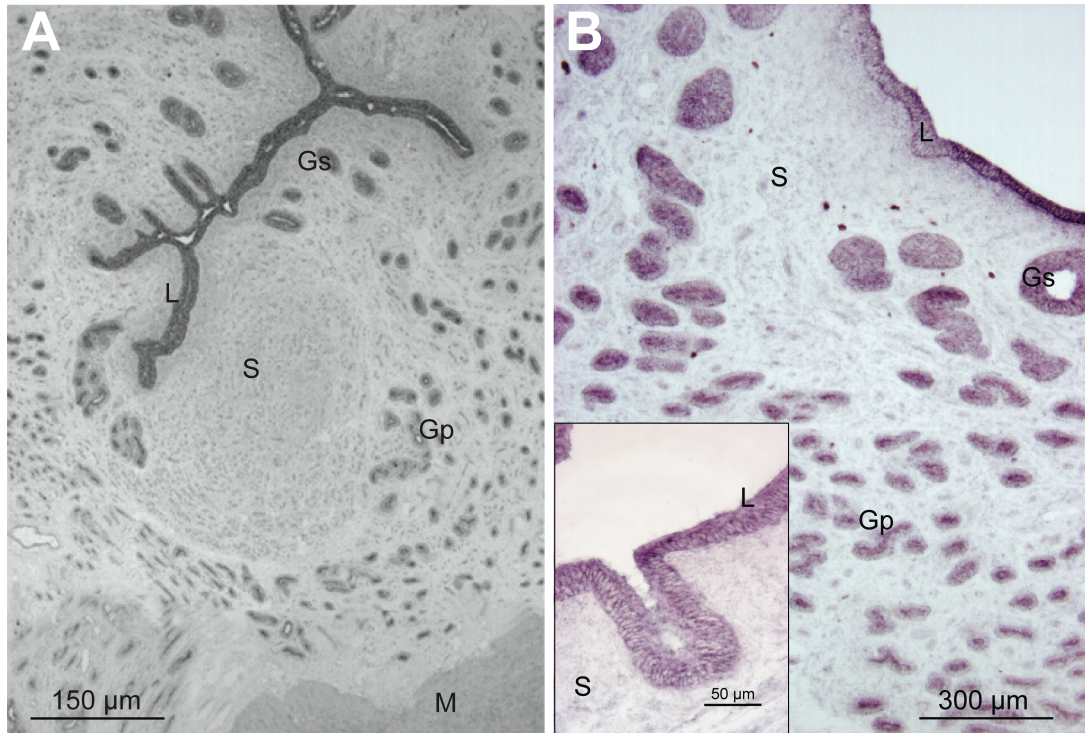
Nom du couple d'amorces	Type descriptif tissu/cellule	N° Accession Genbank	Séquence 5' > 3' et positions	Taille Amplicon (Pb)
12LOXCP2.01	Cornée (plaquette)	Y08829 (1665 Pb)	Sens 1260 GAATCAACTCTGCCATTTCC 1279	277
			Antisens 1536 AACTTTTTCTTTGTGATGCCCC 1515	
12LOXTP19.01	Trachée (leucocyte)	M62516 (2884 Pb)	Sens 1140 TGCCTTCCGTCTATACATCC 1159	250
			Antisens 1389 CATAGAAAGAAGACTTGACTCCC 1367	

Ces amorces ont été testées sur des ARNs totaux d'endomètre et d'autres tissus ovins (cornée, trachée). Les amplicons obtenus par PCR présentaient une taille respective de 277pb et 250pb (voir *Figure 16*). Les couples d'amorces oligonucléotidiques utilisés ont permis de déterminer que l'endomètre de brebis permet l'expression du gène codant pour une **12-lipoxygénase de type plaquettaire**. Les ARNm spécifiques du type leucocytaire ne sont pas présents dans ce tissu. Le séquençage de l'amplicon majoritaire obtenu a permis de s'assurer de sa conformité quant au type de transcrit alox12 recherché (données non montrées).

1.3. Localisation de l'ARN messager codant pour la 12-lipoxygénase dans l'endomètre de brebis

L'endomètre ovin révélant l'expression du gène codant la forme plaquettaire de la 12-lipoxygénase par RT-PCR, nous avons recherché la localisation cellulaire de ses transcrits au sein de ce tissu complexe (voir les types cellulaires le composant au paragraphe I-1. «*Anatomie utérine des ruminants*»).

Cette localisation des transcrits de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire a été rendue possible par Hybridation *in situ* (utilisation de coupes histologiques en congélation de corne utérine ovine fixées au paraformaldéhyde 4%). Une transcription *in vitro* faite à partir de l'amplicon 12LOXCP2.01 cloné en vecteur TA *pCR™4-TOPO®* (Invitrogen – Life Technologies, Thermofisher) a permis de fabriquer des sondes ARN spécifiques (Sens et Antisens). Ces sondes ont été marquées à la digoxygénine (voir *Figure 17*). La révélation a été effectuée avec un anticorps anti-Digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline en présence du substrat de l'enzyme liée (NBT-BCIP).



(Photos de P. Reinaud - UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France)

Figure 17 Localisation par Hybridation *in situ* des ARN messagers de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire sur coupes d'utérus ovin à 9 jours du cycle œstral

Photo A : Coupe histologique transversale d'une corne utérine bovine. Vue d'ensemble des structures composant l'endomètre. Le myomètre périphérique est également visible. Ce cliché permet d'avoir une vue d'ensemble des structures composant une corne utérine après coupe transversale (depuis le muscle périphérique (Myomètre) jusqu'à la lumière utérine interne). La coupe de tissu est colorée en Hématoxyline de Harris/Eosine (photo en niveaux de gris ici) .

Photo B : Coupe histologique transversale d'une zone d'endomètre ovin. Le myomètre n'est pas représenté sur ce cliché. Les compartiments épithéliaux et fibroblastiques sont bien visibles. L'insert représente une invagination de l'épithélium luminal formant une glande superficielle (GS). Localisation des transcrits de la 12-lipoxygénase par hybridation *in situ* avec une sonde ARN Antisens (à 200 ng/µl) spécifique de la 12-lipoxygénase ovine (12LOX CP2 de 277 Pb située sur la zone exon 12- Début exon 14). Cette sonde est couplée à la Digoxigénine (DIG). Un anticorps anti-DIG couplé à la Phosphatase alcaline, en présence de NBT-BCIP permet de révéler la localisation des transcrits recherchés. Le marquage violacé est visible ici dans les épithéliums.

L = Epithélium luminal S = Stroma M = Myomètre GS = Glandes épithéliales superficielles
GP = Glandes épithéliales profondes

Les transcrits de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire sont retrouvés dans les cellules épithéliales lumineales et glandulaires (coloration rose pourpre sur la photo B d'Hybridation *in situ*). Le stroma (cellules de nature fibroblastique) ne présente pas ces ARN messagers. Nous confirmons donc ici la localisation du transcrit de l'enzyme 12-lipoxygénase au sein des structures de nature épithéliale, et donc l'expression du gène correspondant.

1.4. Recherche des transcrits de la 12-lipoxygénase dans divers organes ovins

La 12-lipoxygénase a été décrite dans divers tissus de nature épithéliale chez le bovin : cornée (Liminga *et al.*, 1999), poumon (Shannon *et al.*, 1991)... et le transcrit a donc été recherché dans plusieurs tissus ovins équivalents (voir *Figure 18*).

Des extraits d'ARNs polyA+ purifiés, issus de rate, poumon, surrénale, trachée, peau, cornée et endomètre de brebis ont été analysés par la **technique de Northern blot, seule technique disponible à l'époque de la réalisation de ces expérimentations**. La purification des ARNs PolyA+ permet un enrichissement des échantillons en ARNm. Une sonde radiomarquée au Phosphore 32 (sonde ADN 12LOX-CP2 ³²P) a été utilisée.

Le Northern blot montre un ARN d'une longueur de 3,2 Kb, correspondant vraisemblablement à l'ARNm codant pour l'enzyme ovine recherchée, a été mis en évidence dans divers tissus testés (trachée, peau, cornée), comme décrit dans la littérature scientifique pour l'espèce bovine (Hansbrough *et al.*, 1990; De Marzo *et al.*, 1992). Malgré la purification des ARNs PolyA+, nous n'avons pas pu détecter la présence des transcrits spécifiques de la 12-LOX dans la rate, le poumon ou encore la surrénale de brebis.

En revanche, l'expression des transcrits spécifiques de la 12-lipoxygénase est majoritaire dans le tissu endométrial en comparaison aux autres tissus.

Ainsi, c'est dans l'endomètre ovin que la plus forte expression de transcrit spécifique de la 12-lipoxygénase est observée, la littérature scientifique n'ayant pas jusqu'ici mentionné cette particularité.

1.5. Cinétique d'expression des transcrits de la 12-lipoxygénase au cours du cycle œstral et en début de gestation

L'ARN messenger codant pour la 12-lipoxygénase de type plaquettaire étant exprimé dans les cellules épithéliales lumineales et glandulaires, une recherche de ce transcrit a été menée dans les cellules lumineales de brebis en conditions physiologiques variées (cycle, début de gestation).

Nous avons émis l'hypothèse que le contexte hormonal de l'endomètre pourrait influencer le niveau d'expression du transcrit de l'enzyme au cours du cycle et en début de gestation, en présence d'un embryon.

Son niveau d'expression a donc été évalué dans des extraits de cellules lumineales à divers stades du cycle œstral et du début de gestation par la technique de Northern blot. La sonde ADN 12LOX-CP2 radiomarquée au phosphore 32 a été utilisée (Amplicon de 277 pb déjà présenté au paragraphe III- b *Figure 17*), (voir *Figures 19a et 19b*).

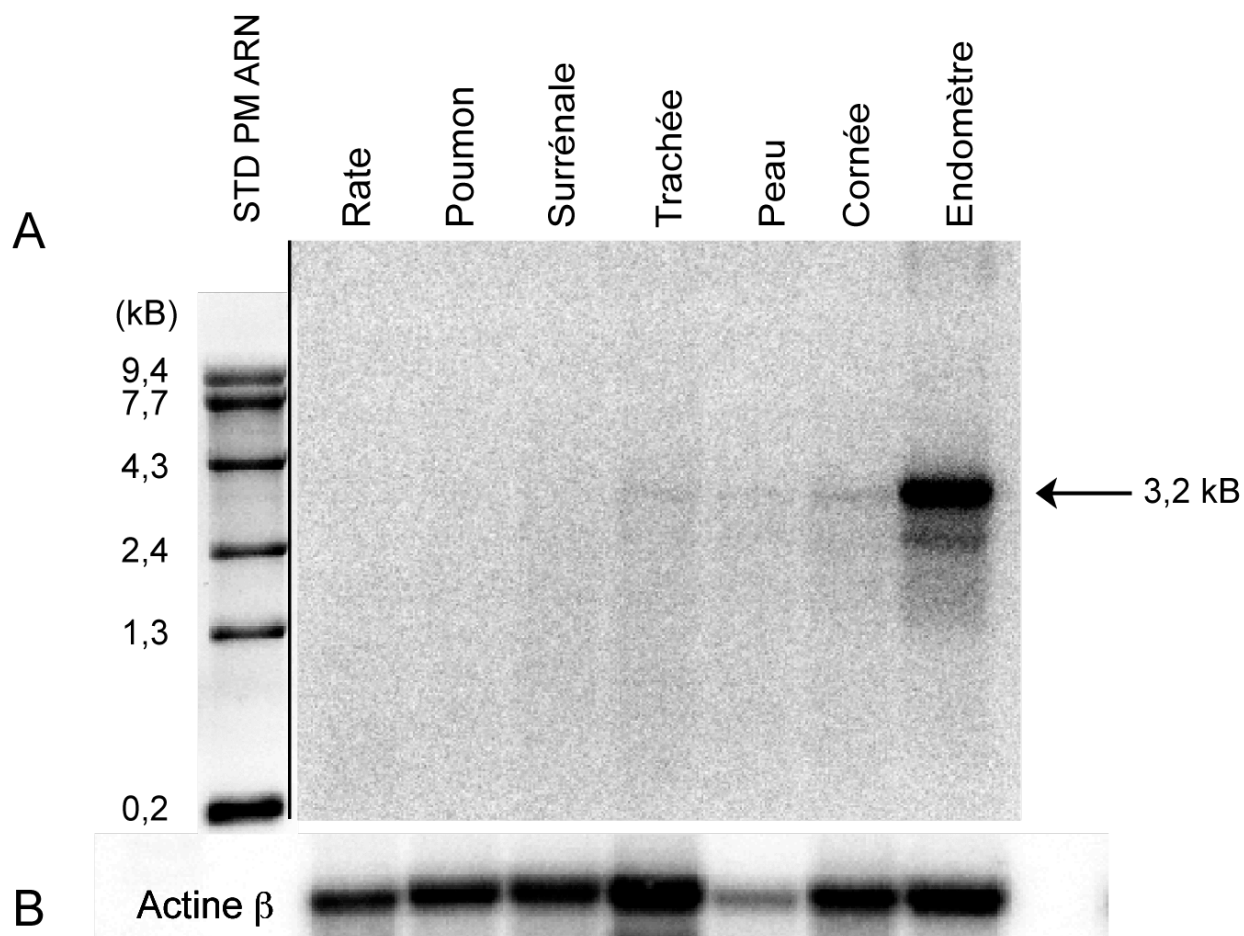


Figure 18 Recherche des transcrits codant la 12-lipoxygénase de type plaquettaire par Northern blot dans divers tissus ovins de nature épithéliale

Des sondes ADNc ovines 12LOX plaquettaire (12LOXCP2.01) (Partie A) et ACTINE Beta (Partie B) marquées au phosphore 32 ont été utilisées.

10 μ g d'ARNm purifiés, issus de divers tissus ovins, ont été déposés dans chaque piste (respectivement : rate, poumon, surrénale, trachée, peau, cornée et endomètre utérin).

Les transcrits de la 12-lipoxygénase ovine de type plaquettaire (3,2 Kb) sont présents entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour du cycle œstral, avec une expression majoritaire en phase lutéale, entre les 9^{ème} et 12^{ème} jours.

En début de gestation, les transcrits sont détectés entre les 7^{ème} et 16^{ème} jours post-fécondation. Un deuxième transcrit de taille inférieure (2,6 Kb) est détectable entre les 12^{ème} et 16^{ème} jours de gestation. Cette période correspond à l'apposition de l'embryon contre la paroi utérine en début d'implantation. La 12-lipoxygénase ayant été décrite lors de phénomènes de prolifération cellulaire, cette observation semble compatible avec la situation physiologique de l'utérus, à un moment où cet organe subit de profonds remaniements tissulaires pour la mise en place de la gestation et le développement d'un embryon.

2. Problématique et objectifs des travaux de ce projet

Nous avons mis en évidence deux transcrits de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules épithéliales de l'endomètre de brebis (épithélium luminal, glandes du stroma). Ces deux transcrits, respectivement de 3,2 et 2,6 Kb, ont été mis en évidence avec une même sonde ADN par Northern blot (dans les limites de sensibilité de la technique). L'expression de ces deux transcrits est modifiée au cours du cycle œstral et en début de gestation, au moment de l'implantation de l'embryon. Il semble donc qu'au cours de ces deux phénomènes physiologiques, l'environnement hormonal et/ou des facteurs histotrophes utérins ou embryonnaires influencent cette expression.

Ces observations nous amènent à nous poser les questions suivantes :

Ces deux transcrits sont-ils traduits en protéines?

L'observation de l'existence de deux transcrits de tailles différentes, codant pour une même enzyme, suggère l'existence d'un phénomène d'épissage alternatif aboutissant à la formation du transcrit entier (forme qu'on nommera "forme longue ou normale") et d'un variant court (= "forme courte"). Un seul article scientifique mentionne l'existence de 2 transcrits de la 12-lipoxygénase et concerne le tractus reproducteur du babouin au cours du dernier trimestre de gestation et au moment du travail (Smith *et al.*, 2001). Aucune autre espèce ne semble présenter 2 transcrits codant pour la 12-lipoxygénase dans les conditions physiologiques explorées. Néanmoins, chez la vache (*Bos taurus*), il a été décrit *via* la technique de Northern blot, l'existence de 2 formes de 15-lipoxygénase de type 2 (Liminga *et al.* 1999).

Dans notre cas, concernant la forme courte du transcrit de la 12-lipoxygénase, cette dernière possède-t-elle une séquence codante permettant la traduction d'une protéine correspondante? Cette séquence est-elle similaire ou différente de celle de la forme "normale"? Ces deux formes de transcrits codent-elles pour des protéines aux activités enzymatiques identiques?

Le clonage de chacune des formes de transcrits dans des vecteurs plasmidiques et un séquençage des clones obtenus seront nécessaires pour tenter de répondre à ces interrogations.

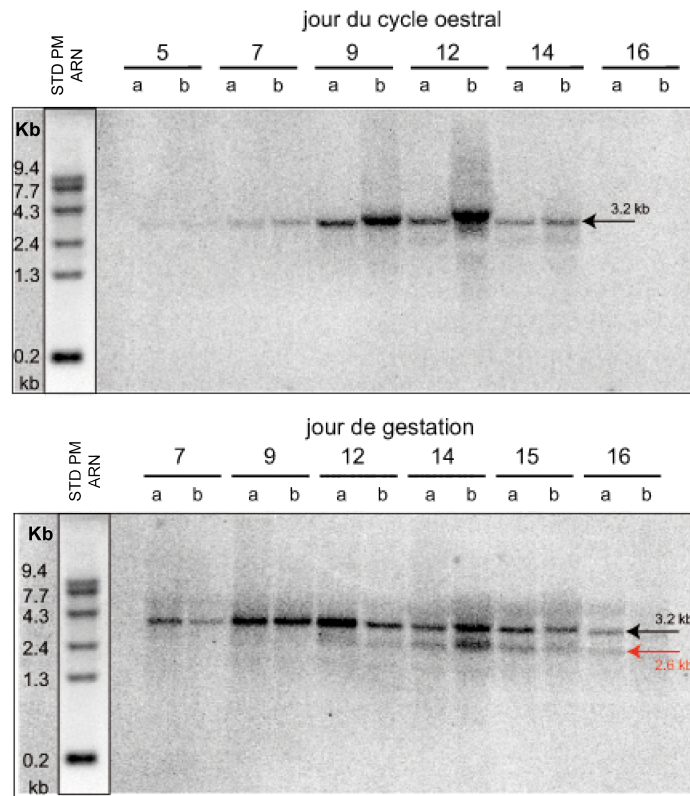


Figure 19a Expression des ARN messagers de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules luminales de l'endomètre ovin au cours du cycle œstral et en début de gestation. Analyse par Northern blot.

La sonde ADNc ovine 12LOX CP2 de 277 Pb, de type plaquettaire, radiomarquée au phosphore 32 a été utilisée.

20µg d'ARNs totaux ont été déposés sur gel d'agarose 0,8 % en conditions dénaturantes pour chaque échantillon de cellules luminales d'endomètre ovin. 2 animaux (brebis a et b) ont été utilisés par stade (cycle, gestation).

La taille estimée des 2 transcrits codant pour la 12-lipoxygénase est respectivement de 3,2 et 2,6 Kb.

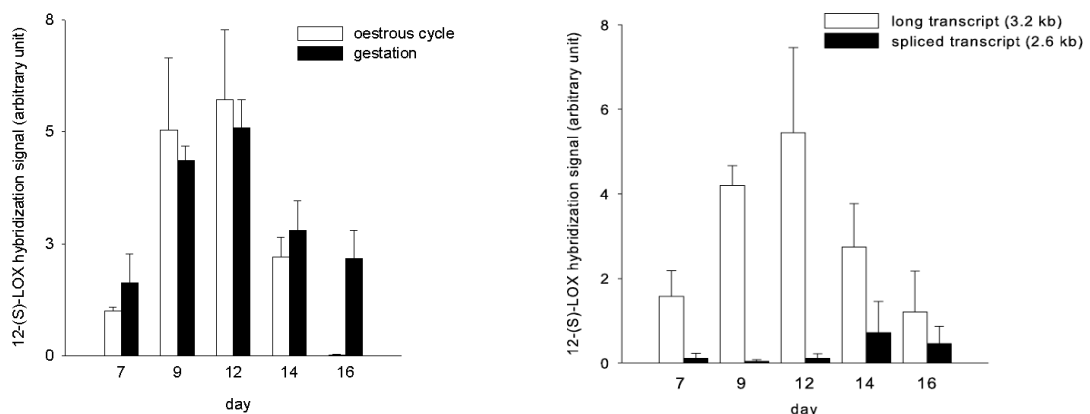


Figure 19b Quantification de l'Expression des deux ARN messagers de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules luminales de l'endomètre ovin au cours du cycle œstral et en début de gestation (Northern blot).

Le graphique de gauche concerne la forme 3,2 Kb (forme "normale" du transcrit). Le graphique de droite compare l'expression des deux formes de transcrits (3,2 et 2,6 Kb) aux jours 7, 9, 12, 14 et 16 de la gestation.

Dans le cas où les deux transcrits sont traduits, les protéines correspondantes sont-elles biologiquement actives ? Quel est le rôle respectif de chacune d'entre elles ?

La stratégie adoptée pour tenter de répondre à ces interrogations consiste à faire appel à une procédure de surexpression de ces protéines car nous ne pouvons purifier les protéines natives, si elles existent, à partir d'endomètres ovins. Les vecteurs plasmidiques dans lesquels chaque transcrit a été inséré nous permettront un transfert des ADNc entiers dans des vecteurs d'expression eucaryotes. Ces derniers, une fois transfectés en cellules eucaryotes, devraient permettre l'obtention des protéines correspondantes. Un test d'activité enzymatique de ces protéines nous renseignera alors sur l'activité putative de chacune d'entre elles *in vitro*.

La démarche expérimentale choisie nous permettra donc :

- ✓ De définir les caractéristiques des deux transcrits (forme longue, forme courte) de la 12-lipoxygénase.
- ✓ De produire les protéines recombinantes correspondantes (avec/sans tag HISTIDINE) et de mesurer leur activité biologique *in vitro*.
- ✓ De localiser la ou les isoformes de protéine(s) 12-lipoxygénase dans l'endomètre utérin ovin (*in vivo*) au cours du cycle œstral et en début de gestation.

Aussi, la démarche expérimentale choisie se décline comme suit :

- Isolement et analyse des transcrits entiers dans l'endomètre ovin

- Obtention des ADNc correspondant aux ARNs messagers complets, identifiés grâce à la technique de RACE (*Rapid Amplification of cDNAs Ends*).
- Clonage des ADNc obtenus dans un vecteur *pGEM®-T Easy* (*Promega*).
- Séquençage permettant de caractériser chacun des ARNm.

- La synthèse *in vitro* des protéines putatives codées par les deux transcrits isolés (voir Figure 20)

- Clonage de chaque ADNc en vecteur d'expression procaryote (plasmide *pET-16b* et transformation de bactéries *E. coli* souche *BL21*) ou/et eucaryote (plasmide *pCMV βGal* et transfection de cellules de lignée COS-7) avec la possibilité d'addition d'une étiquette 6X HISTIDINE dans l'objectif de purifier les protéines ainsi produites. Les constructions plasmidiques en *pCMV* devront permettre d'obtenir des protéines recombinantes avec/sans tag HISTIDINE après transfection de cellules animales. Le vecteur *pET-16b* permet la production des protéines avec une queue poly-Histidine ("Tag" ou "étiquette") dans des bactéries.
- La caractérisation des protéines produites devra être effectuée en partie par la technique de Western blot. Ce protocole nécessite de disposer au préalable d'anticorps spécifiques de chacune des formes de 12-lipoxygénase plaquettaire.
Il faudra donc envisager, pour ce faire, une immunisation de lapins à l'aide de peptides dessinés à partir de la traduction des 2 transcrits d'origine (séquences obtenues des expérimentations en RACE).
Les immunosérums de lapins seront préalablement caractérisés (conditions d'utilisation en western blot, en immunohistochimie, purification des sérums obtenus...).

- L'activité biologique des protéines recombinantes produites par mesure de l'activité de conversion de l'acide arachidonique radiomarqué en 12-HETE. Cette évaluation sera effectuée sur extraits de protéines totales du modèle cellulaire retenu par une technique de chromatographie (HPLC). Un test de compétition des 2 formes est à envisager.

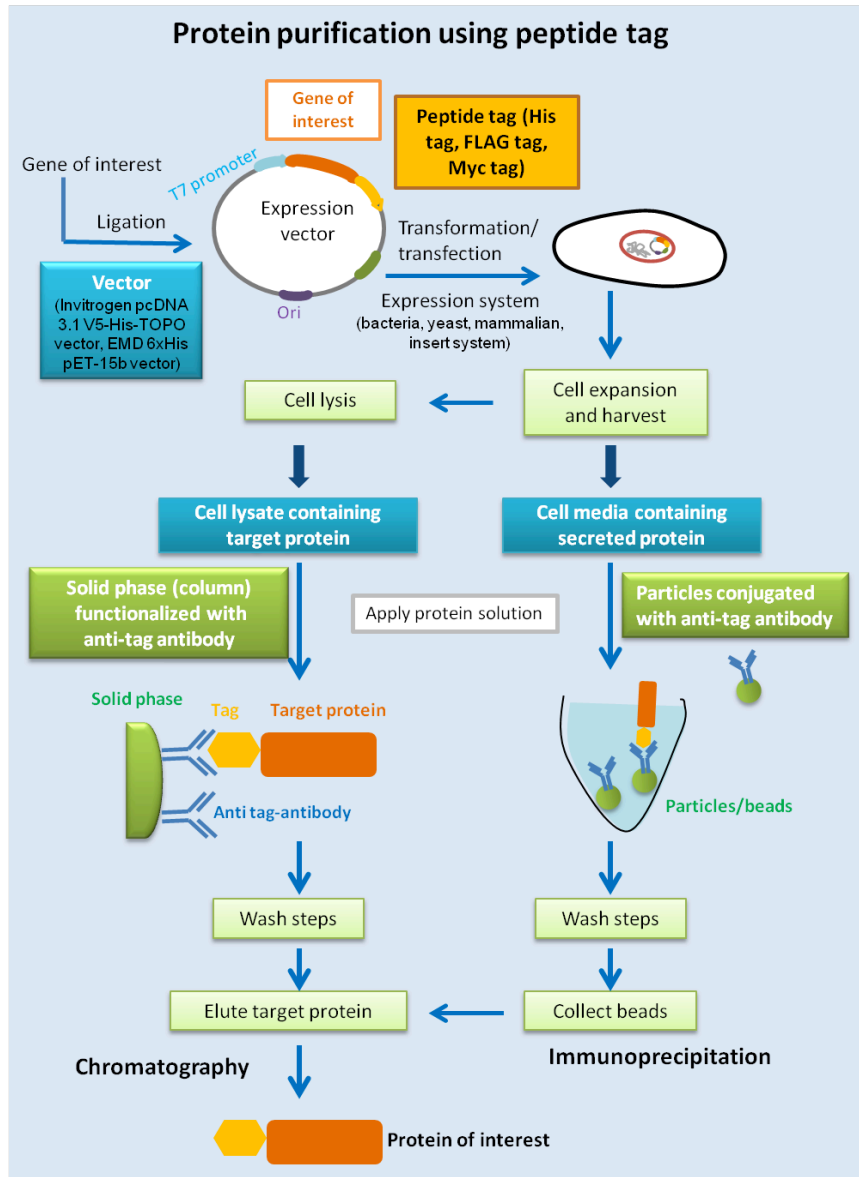


Figure 20 Représentation schématique de la purification de protéines recombinantes utilisant un tag peptidique

- La purification des protéines recombinantes sur colonnes avec une matrice de « cobalt » et l'analyse des différentes fractions chromatographiques obtenues. L'activité biologique des protéines recombinantes purifiées sera également évaluée (voir *Figure 20*).

- Etablir la cinétique de production endogène des protéines spécifiques de chacune des 2 formes de 12-lipoxygénase dans les cellules lumineales utérines, par la technique de Western blot à l'aide des immunosérums de lapins, au cours du cycle œstral et en début de gestation.

B/ Matériels et Méthodes

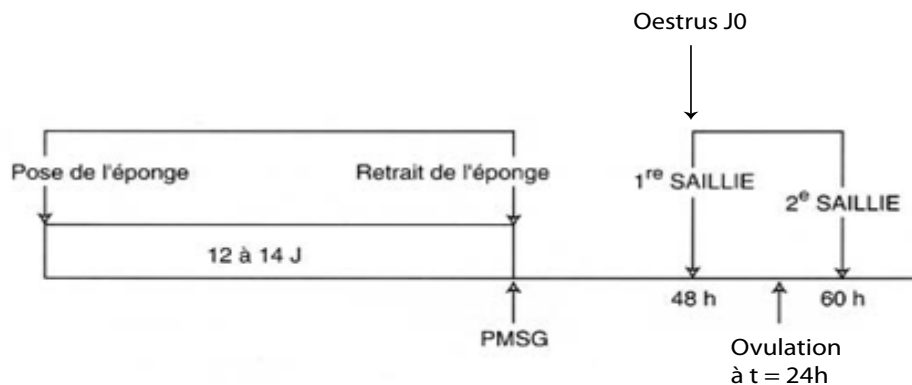


Figure 21 Schéma de maîtrise hormonale du cycle œstral et de mise en gestation appliqué à l'espèce ovine en élevage

Le cycle œstral des brebis est synchronisé par utilisation d'un progestagène de synthèse pendant 14 jours. Une injection de PMSG permet la maturation folliculaire et l'apparition de l'œstrus, donc une entrée en chaleur, facilitant ainsi la datation du stade du cycle ou de la gestation souhaité.

IA = Insémination Artificielle

(Schéma modifié, d'après Prof. Rachid Boukhliq, DMV, PhD Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II <http://www.ma.auf.org/ovirep/cours4/lsynchro.htm>)

I- Animaux utilisés dans ce projet

1. Petits ruminants : Une espèce ovine, la brebis (*Ovis aries*)

L'étude a été réalisée sur des brebis de race *Préalpes du sud* disponibles à l'Unité Commune d'Expérimentation Animale du centre de recherche INRA de Jouy-en-Josas. Les procédures relatives à l'élevage, aux soins et l'utilisation de ces animaux sont approuvées par le ministère français de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, selon la législation en vigueur inhérente à l'expérimentation animale (*Loi du 19/04/1988, Autorisation N°78-34*). La synchronisation des chaleurs est une méthode de maîtrise hormonale des cycles fréquemment utilisée en élevage. Le cycle œstral de brebis adultes, d'une durée de 17 jours, a été synchronisé en utilisant des éponges intra-vaginales imprégnées de 60 mg d'un progestagène de synthèse (6 α -méthyl-17 α -acétoxyprogesterone ou acétate de flugestone) (Peterson *et al.*, 1976). Le dérivé de progestérone bloque l'activité ovarienne, supprimant ainsi les chaleurs. La levée de cette inhibition entraîne le redémarrage du cycle et donc l'induction des chaleurs. La durée de pose d'éponge est de 12 jours en saison sexuelle (ou de 14 jours en contre-saison). Le jour du retrait de l'éponge, une injection par voie intramusculaire de 500 UI de PMSG par voie intramusculaire (ou *Pregnant Mare Serum gonadotropin*), ce qui favorise la maturation ovocytaire et le renforcement de l'ovulation. L'œstrus apparaît 48 heures après (jour 0 du cycle). L'ovulation s'effectue 12 à 24 heures après l'œstrus.

La lutte naturelle est utilisée pour les brebis destinées à la gestation, le bélier étant placé deux fois en leur présence 48 et 60 heures après le retrait de l'éponge (voir *Figure 21*).

Aux jours 9, 12, 14 et 16 du cycle œstral et du début de gestation, les brebis sont euthanasiées. Trois à sept animaux sont utilisés pour chaque stade du cycle ou de la gestation. L'utérus est récupéré. Les embryons des brebis gravides sont récupérés par lavage des cornes utérines par une solution tampon de PBS, puis congelés en azote liquide avant leur stockage à -80°C. Le statut de gestation de chaque animal confirmé. Les cornes utérines de chaque brebis sont ouvertes longitudinalement, étalées et les cellules de l'épithélium luminal sont récupérées par passage d'une lame de scalpel en surface. Les cellules sont congelées en azote liquide avant leur stockage à -80°C, en attente de leur extraction (ARNs totaux, protéines totales). Une portion de corne utérine de chaque animal est fixée au paraformaldéhyde 4 % en Tampon PBS (4h à +4°C), rincée en tampon PBS puis incluse en milieu d'enrobage pour congélation (*Tissue-Tek® O.C.T.™, Thermofisher*) avant congélation en azote liquide et stockage à -80°C en vue des analyses histologiques.

Divers tissus de brebis sont également prélevés après euthanasie des animaux : rate, poumon, surrénale, peau, endomètre entier, cornée et trachée.

Les cornées sont prélevées sur les yeux par simple découpe à la lame de scalpel sur leur pourtour et l'épithélium superficiel des trachées est prélevé par décollement. Chaque type de tissu est isolé en tubes polypropylène stériles. Ces tubes sont congelés en azote liquide puis stockés à -80°C en attente d'extraction des ARNs totaux.

```

L4_refseq090122      MGRYRILVATGASLFAGSHNRVQLWLVGARGETELELQLRPVARGQKEEFEHEVPGDLGPL
LN10_REFSEQ090122   MGRYRILVATGASLFAGSHNRVQLWLVGARGETELELQLRPVARGQKEEFEHEVPGDLGPL
*****

L4_refseq090122      QFVKLRKHHSLVDDAWFCDRITVQGGPACEEAAFPYRWWQGDGVLCLEPEATARLAGNNA
LN10_REFSEQ090122   QFVKLRKHHSLVDDAWFCDRITVQGGPACEEAAFPYRWWQGDGVLCLEPEATARLAGNNA
*****

L4_refseq090122      LDVFQRHREKELKERHKEYRWATWKEGLPLTIAAGCEDDLPANMRFHEEKRLDFEWTLKA
LN10_REFSEQ090122   LDVFQRHREKELKERHKEYRWATWKEGLPLTIAAGCEDDLPANMRFHEEKRLDFEWTLKA
*****

L4_refseq090122      GALEMVLKRVYTLSSWTSLEDFDLIFWGQKSPLAEKVHQRWQDDELFGYQFLNGANPML
LN10_REFSEQ090122   GALEMVLKRVYTLSSWTSLEDFDLIFWGQKSPLAEKVHQRWQDDELFGYQFLNGANPML
*****

L4_refseq090122      LRRCTSLPSRLVLPSPGMEELRAQLERELQNGSLFEADFI LLDGIPANVIRGEKQYLAAPL
LN10_REFSEQ090122   LRRCTSLPSRLVLPSPGMEELRAQLERELQNGSLFEADFI LLDGIPANVIRGEKQYLAAPL
*****

L4_refseq090122      VMLKMDPSGKLLPMVIQIQPPSPISPTPPLFLPSDPPLAWLLAKTWVRNSDFQLHQLYH
LN10_REFSEQ090122   VMLKMDPSGKLLPMVIQIQPPSPISPTPPLFLPSDPPLAWLLAKTWVRNSDFQLHQLYH
*****

L4_refseq090122      LLNTHLLAEVIAVATMRCPLGLHPVFKLLMPHIRYTMEINTRARTQLISDGGIFDKAVST
LN10_REFSEQ090122   LLNTHLLAEVIAVATMRCPLGLHPVFKLLMPHIRYTMEINTRARTQLISDGGIFDKAVST
*****

L4_refseq090122      GGGGHVHLLRRALAQLTYRSLCPLDDLADRHL LGTPGALYACDALRLWEITARYVEGIVH
LN10_REFSEQ090122   GGGGHVHLLRRALAQLTYRSLCPLDDLADRHL LGTPGALYACDALRLWEITARYVEGIVH
*****

L4_refseq090122      LFYHGDDVVKGDPELQAWCREITEVGLRQAQERGFVPSFQSQNLCHFLTMCVFTCTAQH
LN10_REFSEQ090122   LFYHGDDVVKGDPELQAWCREITEVGLRQAQERGFVPSFQSQNLCHFLTMCVFTCTAQH
*****

L4_refseq090122      GAINQGQLDWYAWVPNAPCTMRMPPPTTKEDVTMATVMGSLPDVRQACLQMAITWHLGRR
LN10_REFSEQ090122   GAINQGQLDWYAWVPNAPCTMRMPPPTTKEDVTMATVMGSLPDVRQACLQMAITWHLGRR
*****

L4_refseq090122      QPDMGIFSIQRSNLH-----LLHWQLDSLPLHH-----LGSP*-----
LN10_REFSEQ090122   QPDMVPLGHHKEKYFSDPKAKSVLNQFQTDLENLEREITARNEQLDLPYEYLPKSHIENS
****  . . . . . * : * * * . : *

L4_refseq090122      ---
LN10_REFSEQ090122   VTI*

```

Longueur des séquences peptidiques déduites :
L4 = 632 A.A. soit 70,263 KDa (Transcrit séquence codante de 1899 bases)
LN10 = 663 A.A. soit 73,704 KDa (Transcrit séquence codante de 1992 bases)

Peptide L4 (12LOX-L4 "CP18") (17 A.A. + 1) Cys-LLHWQLDSLPLHHLGSE

Peptide LN10 (12LOX-LN10 "HC17") (16 A.A. + 1) HKEKYFSDPKAKSVLN-Cys

Figure 22 Alignement des séquences peptidiques déduites des deux transcrits 12-lipoxygénase clonés en plasmides pGEM®-T Easy. Utilisation du logiciel CLUSTAL W2 de la suite EMBOSS

Les deux séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques de la forme courte et la forme normale de la 12-lipoxygénase ovine diffèrent entre elles dans leurs parties C-Terminale (au niveau de l'exon 14 de leur transcrit respectif).

Les peptides spécifiques (L4 CP18 et LN10 HC17) sont définis dans cette zone. Un couplage à la KLH, facilité par l'addition d'une Cystéine de jonction, permet de rendre chaque peptide plus immunogène lors des injections aux lapins.

2. Lagomorphe : Le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) et protocole d'immunisation pour l'obtention d'anticorps anti-12-lipoxygénase ovine

Des lapins, de souche *New Zealand White*, élevés à l'animalerie du centre de recherche INRA de Jouy-en-Josas ont été utilisés pour la production d'anticorps anti-12-lipoxygénase ovine.

Deux lots de deux lapins, mâles d'environ 3 Kg, âgés de 3 mois, sont entrés en expérimentation pour les immunisations à l'aide de peptides, respectivement par lot :

- un peptide L4 (CP18) de 18 Acides aminés correspondant à la forme courte de la 12-lipoxygénase ovine (nommée L4),
- un peptide LN10 (HC-17) de 17 Acides aminés correspondant à la forme normale de la 12-lipoxygénase ovine (nommée LN10).

2.1. Choix des peptides

En utilisant la fonction "Transeq" (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) de la suite logicielle EMBOSS, nous avons pu déduire les séquences protéiques de chacun des transcrits isolés de la 12-lipoxygénase (séquençages effectués après expérimentations de RACE et sous-clonages). Un alignement des deux séquences peptidiques *via* l'utilisation de cette suite logicielle EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) nous a alors permis d'identifier les différences entre les deux séquences peptidiques. Les peptides spécifiques de chacune des deux protéines putatives ont été définis sur cette portion correspondant à la partie C-terminale des séquences (voir *Figure 22*).

Etant de courte taille, les peptides sélectionnés sont couplés à une protéine capable de déclencher le système immunitaire, la KLH ("Keyhole Limpet Hemocyanin"), isolée d'un gastéropode marin. La synthèse et le couplage à la KLH des deux peptides sont produits par le prestataire de service *Protéogenix*.

2.2. Immunisation

Le protocole de production d'anticorps par immunisation de lapins est approuvé par le Comité d'Éthique appliqué à l'expérimentation animale du centre INRA de Jouy-en-Josas - AgroParisTech (CEEA N°45) (avis 12/061). Les 2 peptides couplés à la KLH sont injectés par voie intradermique à des lapins. Deux animaux sont prévus par peptide utilisé.

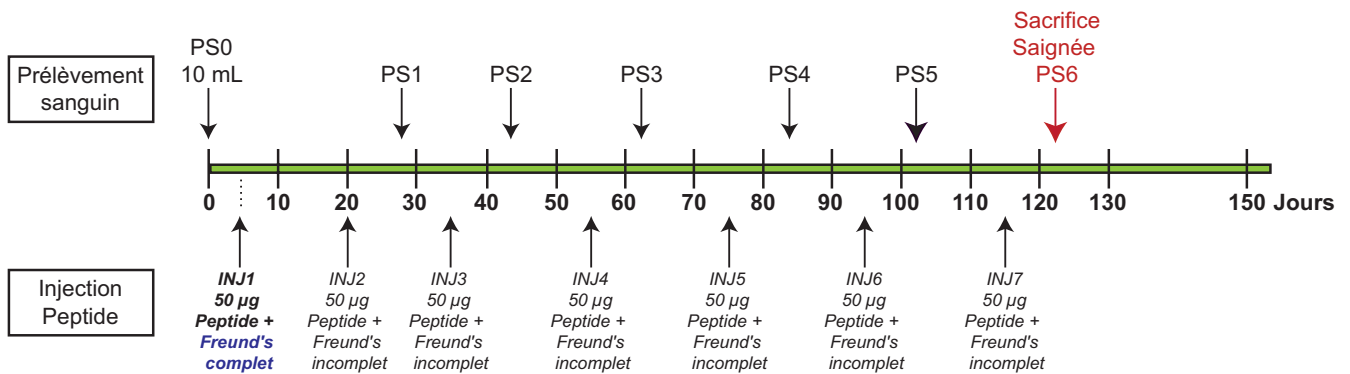
Les peptides sont solubilisés dans du sérum physiologique apyrogène (NaCl 9 ‰) à la concentration de 5 µg/µl. Pour chaque peptide couplé à la KLH, 10mg sont mis en solution.

Lors de la première injection, le complexe peptide-KLH est dilué dans une solution composée de 50 % de sérum physiologique (NaCl 9 ‰) et 50 % d'adjuvant de Freund complet (1 mg/ml d'extrait de *Mycobacterium tuberculosis*, 85 % d'huile de paraffine et 15 % de mono oléate de mannose, *Sigma-Aldrich* # F5881).

Lors des injections suivantes, le complexe est dilué dans une solution également composée de 50 % de sérum physiologique mais de 50 % d'adjuvant de Freund incomplet (85 % d'huile de paraffine et 15 % de mono oléate de mannose, *Sigma-Aldrich* # F5506).

Remarque : Quelques jours avant la primo-injection, 10 à 12 ml de sang total de chaque lapin (PS0) sont prélevés afin de s'assurer que le sérum de l'animal ne présente pas d'anticorps susceptibles de créer une réaction croisée avec le peptide.

Lors de chaque injection, 50 µg de peptide couplé à la KLH sont administrés à chaque lapin sous un volume final de 1 ml. Chaque lapin reçoit tous les 15 jours une injection intradermique, sur le flanc rasé, répartie en une dizaine de points, ces 50 µg de peptide solubilisé en «sérum physiologique / Adjuvant de Freund».



PS1 à PS6 = Prise de Sang (25 à 30 mL)

INJ = INJection intra-dermique de 50 µg de peptide sous 1 mL Sérum Physiologique/Adjuvant

Figure 23 Chronogramme du protocole d'immunisation des lapins par peptide

2 lapins sont utilisés pour l'immunisation par chacun des deux peptides (12LOX L4 "CP18" et 12LOX "HC17"). Les animaux entrent en expérimentation avec un poids de 3 Kg et leur prise alimentaire, ainsi que le poids sont contrôlés régulièrement afin de détecter tout problème de toxicité liée au traitement.

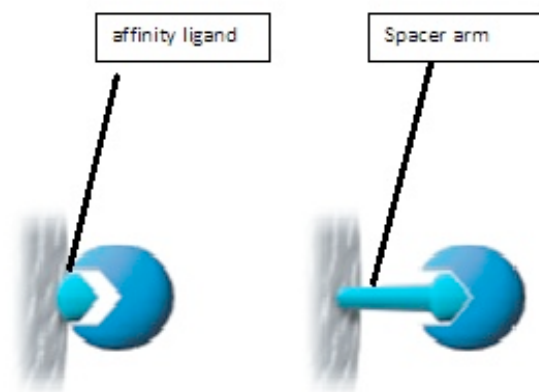


Figure 24a Principe de purification des immunoglobulines IgG par chromatographie d'affinité sans bras espaceur (à gauche) ou avec bras espaceur (à droite) (d'après <http://vlab.amrita.edu/>)

Ce système de purification est utilisé pour améliorer la liaison entre le ligand (ici le peptide spécifique «représenté par la boule bleue») et la molécule cible (IgG à purifier dans l'immunsérum) en surmontant les effets d'encombrement stérique. Le peptide utilisé peut présenter une conformation non linéaire et être donc inaccessible aux IgG spécifiques présentes dans le sérum à purifier. Le bras espaceur est une chaîne de carbone intercalé entre le peptide et la matrice, permettant alors un meilleur accès du peptide aux IgG correspondantes.

Les systèmes *HiTrap™ PROTEIN A HP* et *HiTrap™ NHS activated HP* n'ont pas de bras espaceur.

Les colonnes "*SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides*" utilisent le système de bras espaceur.

Sept injections espacées de 12 à 15 jours sont réalisées et chacune est suivie d'un prélèvement de sang une semaine environ après l'administration (voir *Figure 23*).

La primo-injection consiste à administrer 50 à 100µg de peptide couplé à la KLH solubilisé en sérum physiologique / Adjuvant de Freund complet (50 / 50) sous un volume équivalent. 7 injections espacées d'une quinzaine de jours seront effectuées sur une durée totale d'environ quatre mois.

Après ces 4 mois d'immunisation (une semaine environ après la 7ème injection), les animaux sont sacrifiés et saignés en totalité. Le sérum est obtenu de la même manière que décrite précédemment.

Une semaine après chaque injection, une vénipuncture (prise de sang veineux) dans la veine marginale de l'oreille est réalisée. Un volume compris entre 25 et 30 ml de sang total est prélevé en tube de polypropylène stérile 50 ml (en fonction du poids de l'animal).

Le sérum est obtenu après coagulation du sang pendant 1 à 2h à température ambiante suivie d'une centrifugation à 3000 tours/min pendant 30 minutes à +4°C.

Le sérum est prélevé en totalité (soit environ 50 % du volume initial de sang total) et réparti en microtubes stériles de 2 ml. Ces microtubes sont ensuite congelés à -20°C pour leur conservation avant leur utilisation (Western blot, immunocytochimie).

2.3. Purification des anticorps

Les immunoglobulines contenues dans les immunosérums prélevés après la 6ème injection (soit la Prise de sang N°5 ou PS5) sont évaluées.

Les immunoglobulines IgG ont été purifiées de différentes façons à partir des immunosérums, par chromatographie d'affinité (voir *Figure 24a*) sur trois types de colonnes :

- *HiTrap™ PROTEIN A HP (GE Healthcare Life Sciences)* permettant la purification des IgG totales de chaque sérum (immobilisation d'une protéine bactérienne, la protéine A, sur la matrice, la protéine A présentant une haute affinité pour le fragment Fc de toutes les immunoglobulines),

- *HiTrap™ NHS activated HP (GE Healthcare Life Sciences)* permettant la purification des IgG spécifiques des 2 formes de 12-lipoxygénase de chaque sérum, grâce à la fixation covalente du peptide respectif sur les amines primaires,

- "*SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides*" (*ThermoFisher*) permettant la purification des IgG spécifiques des 2 formes de 12-lipoxygénase de chaque sérum, grâce à la fixation covalente du peptide, *via* un de ses acides aminés soufrés, respectif sur un "bras" fixe lié à la matrice de la colonne de purification, un groupement iodoacétyl (voir *Figure 24b*). Ce système permet de tenir à distance de la matrice le peptide linéarisé, le rendant plus facilement accessible aux IgG correspondantes. Toute configuration secondaire ou tertiaire du peptide est ainsi évitée.

Pour les deux derniers systèmes, chaque peptide respectif est immobilisé sur la colonne suivant les instructions du fournisseur. Les colonnes sont équilibrées avec un tampon 20 mM phosphate pH 7.1. Les immunoglobulines sont éluées avec un tampon glycine/HCL 0.2 M à pH 2.8 puis dialysées et concentrées contre un tampon phosphate à pH neutre en utilisant une unité d'ultrafiltration *Amicon* munie d'une membrane *YM10 (Millipore)*.

Les IgG purifiées sont dosées par spectrophotométrie ($\lambda = 260 \text{ nm}$) puis testées à la concentration de 0,5 µg/ml sur des extraits de protéines totales et l'analyse est faite par Western blot.

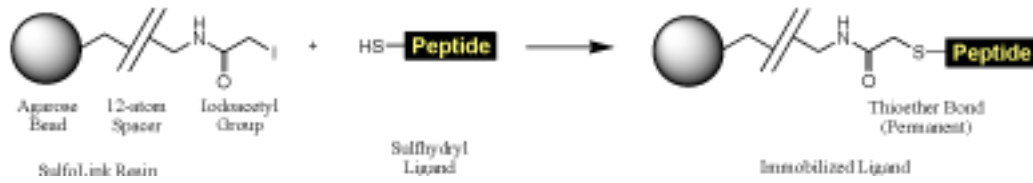


Figure 24b Principe de purification des immunoglobulines IgG par chromatographie d'affinité "SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides" (ThermoFisher)

II- Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Cette technologie a été utilisée afin de :

- déterminer le profil des métabolites de l'acide arachidonique synthétisés (par l'épithélium luminal de l'endomètre, par les protéines recombinantes) via une colonne analytique,
- purifier les immunsérums de lapins anti-peptides 12-lipoxygénase sur colonnes *Hitrap™* et *Sulfolink®* (pour ce point, voir instructions des fabricants *GE Healthcare*, *Pierce®* *Thermofisher*).

Analyse et identification des métabolites issus de la 12-lipoxygénase endométriale

Un culot de cellules lumineales a été mis en suspension (0,2 DO à $\lambda = 490$ nm) par pipetages/refoulements dans 1 ml de solution tampon d'activité (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, 4 mM CaCl₂, 4 mM Glutathion pH 7.4) (Izumi *et al.*, 1990).

Une sonication du mélange est réalisée quelques secondes à froid, dans un bain de glace.

1,5 ml de tampon d'activité est ajouté à 1 ml de d'extrait soniqué (volume total = 2,5 ml). 100 μ l de ce mélange sont prélevés. 1 μ Ci sous 10 μ l d'acide arachidonique tritié [5,6,8,9,11,12,14,15, ³H (N)] à 0,5 Ci/ml (Activité spécifique 200 Ci/mmol) (*Amersham Biosciences* ou *GE Healthcare*). 6 μ g d'acide arachidonique non marqué (acide éicosatétraénoïque 5Z,8Z,11Z,14Z) (*Cayman*, *Bertin pharma*) sont également ajoutés aux 100 μ l d'extrait soniqué. Le tube est incubé au bain-marie à +38°C pendant 10 minutes (Ho *et al.*, 1977). La réaction de conversion est arrêtée au bout d'une heure par addition d'acide citrique 1 M (10% du volume d'incubation). Un extrait soniqué de cellules lumineales témoins ne contenant pas d'arachidonique radioactif a été mis en incubation dans des conditions identiques afin d'évaluer l'instabilité possible de l'acide arachidonique.

Les échantillons ont été extraits et analysés simultanément en une seule étape opératoire d'HPLC comme décrit par G. Charpigny (Charpigny *et al.* 1997a; Charpigny *et al.*, 1999) avec quelques modifications. L'extraction de l'acide arachidonique résiduel et du métabolite 12-S-HETE radiomarké se fait par addition d'un mélange Cyclohexane 50% / Acétate d'éthyle 50% (5 ml pour 3 ml de mélange réactionnel). Un passage au vortex permet de faciliter l'extraction. Les tubes sont laissés au repos sur portoir à température ambiante quelques minutes afin de faciliter le partage de phase. La phase organique supérieure est récupérée et mise en évaporation sous azote jusqu'à obtention d'un résidu humide. Le culot obtenu est alors repris et solubilisé par 50-100 μ l d'éthanol absolu. Les métabolites de l'acide arachidonique ont été séparés en utilisant une pré-colonne contenant de la silice octadécylsilylée (*Nucleosil C18*, 30 mm, 4,6 mm; *Touzart et Matignon*) connectée à une colonne analytique (*Zorbax C18*, 250 mm 4,6 mm, *Shandon*).

Les produits ont été détectés par un système HPLC en utilisant un détecteur UV (*modèle 490*, *Waters*) et un détecteur de radioactivité (*modèle Flo-One A500*, *Packard*) équipé d'une cellule de 0,5 ml pour comptage par scintillation en phase liquide. Le liquide scintillant utilisé (*Flo-Scint III*, *Packard*) a été délivré à la vitesse de 3 ml/min.

Les échantillons ont été ajustés à une concentration finale de 15% de méthanol et injectés dans une boucle de 10 ml, connectée à la pré-colonne équilibrée avec 15% de méthanol contenant 0,01% d'acide acétique. La pré-colonne a été lavée pendant 8 min à un débit de 2 ml/min et a été couplée à la colonne de séparation. En phase inverse, la séparation par HPLC des métabolites d'acide arachidonique a été menée à 1 ml/min avec un mélange Eau : acide acétique (100:0,01) (mélange A) et Acétonitrile : Eau (100:0,01) (mélange B), selon la séquence suivante : 0 à 32 min en élution isocratique (36% B), 32 à 40 min en gradient linéaire (50 % B), 40 à 52 min en gradient linéaire (55 % B), 52 à 76 min en gradient linéaire (60 % B), 76 à 100 min en élution isocratique (90 % B).

Des solutions standards ont été obtenues de *Cayman Chemical* (*Bertin Pharma*), en flacons de verre individuels sous azote : PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , Thromboxane B₂, 6-céto PGF₁ α , 13,14-dihydro-15-céto-PGF₂ α (dhk-PGF₂ α), 13,14-dihydro-15-céto PGE₂ (dhk-PGE₂), LT (mélange LTA₄, LTB₄, LTC₄ et LTD₄), HHT ou acide Hydroxy-HeptadécaTriénoïque et divers HETEs ou acides Hydroxy-EicosaTétraÉnoïques (5, 11, 12 et 15-HETE).

III- Biologie moléculaire au sein de ce projet

1. Extraction des ARNs totaux de tissus et cellules luminales de brebis

L'extraction suit le protocole adapté de (Chomczynski *et al.*, 1987).

Les ARNs totaux sont extraits par une solution de lyse (4 M Thiocyanate de Guanidine, 25 mM Tri-sodium citrate, 0,50 % N-Lauroyl Sarcosine, 100 mM β -mercaptoéthanol). Les cellules sont lysées dans cette solution par simple pipetages/refoulements et puis agitation au vortex. Quant aux tissus, ceux-ci sont broyés dans la solution dénaturante à l'aide d'une tige *Polytron® (Kinematica)* stérilisée.

Le lysat est acidifié par l'acétate de sodium pH 4-5 (concentration finale de 0,3M en mélange) puis est ensuite extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique ((24:1:1) suivi d'une centrifugation à +4°C afin de faciliter le partage de phases. La phase aqueuse supérieure contient les ARNs totaux et la phase organique sous-jacente, l'ADN et les protéines. La phase aqueuse est prélevée et mise ensuite en précipitation par l'isopropanol pendant 1 nuit à -20°C (volume à volume).

Après 16h de précipitation par l'isopropanol, les tubes sont centrifugés à +4°C. Les surnageant sont éliminés et les culots lavés deux fois successivement par de l'éthanol froid à 70 %. Les culots lavés sont ensuite transférés en microtubes 1,5 ml stériles, l'alcool résiduel est évaporé quelques minutes et une solubilisation des culots est effectuée en eau purifiée stérile dans un volume compatible avec la taille de chaque culot.

Après solubilisation en eau, un dosage spectrophotométrique des ARNs totaux est fait ($\lambda = 260$ nm).

Dans le cas des tissus entiers (cornée, trachée, surrénale, endomètre, rate, poumon et surrénale), l'extraction se fait de la même manière en doublant les étapes finales de l'extraction par solution de lyse et de la précipitation en isopropanol.

Les ARNs polyA+ ont été purifiés à partir des extraits d'ARNs totaux en utilisant le kit *PolyAtract® mRNA Isolation System (Promega)*. Ce kit fait appel à une technologie de billes magnétiques sur lesquelles sont fixés des amorces oligo(dT)_{12-18 Mers} permettant la capture des ARNs messagers des extraits *via* leur extrémité 3' polyA. Les billes sont ensuite lavées dans une solution tampon à forte stringence et les ARNs messagers sont libérés par simple élution dans l'eau.

2. RT-PCR pour la recherche du type de 12-lipoxygénase

2.1. Transcription Inverse (ou RT)

A partir des ARN totaux, une transcription inverse est faite afin de disposer d'ADN complémentaires, matrices nécessaires à la PCR.

La RT est réalisée à partir d'1 μ g d'ARNs totaux d'endomètre auxquels sont ajoutés 500 ng d'amorce oligo(dT)_{12-18 Mers}. Une incubation à +70°C de 10 minutes est réalisée. 200 UI de transcriptase MMLV (*Murine Moloney Leukemia Virus, Life Technologies, Thermofisher*) sont ajoutés en présence d'une solution tampon RT 1X, 0,5 mM de dNTPs et de 10 mM de DTT. L'incubation du mélange se fait à +37°C pendant 1h. L'arrêt de la réaction est réalisé à +70°C pendant 15 minutes et le mélange est refroidi sur glace avant stockage à -20°C ou utilisation en PCR.

2.2. Amplification en chaîne par Polymérisation (ou PCR)

Les amorces oligonucléotidiques de chaque forme de 12-lipoxygénase (12LOXCP2.01F/R pour la forme plaquettaire, 12LOXTP19.01F/R pour la forme leucocytaire) ont été dessinées

à partir des séquences codantes des ARN messagers bovins respectifs disponibles (voir chapitre *A/ Introduction, Tableau 3*).

Une amplification est réalisée selon le protocole classique (*QBIogene, MP Biomedicals*) à l'aide du *Taq Core Kit™*. La PCR se déroule sur 35 cycles et la température d'hybridation des amorces est de +53°C.

3. Northern blot

La séparation des ARNs totaux extraits est effectuée sur gel d'agarose 0,8 % en tampon de migration (conditions dénaturantes) (2,4 M Formaldéhyde / 1X Tampon MOPS / Eau). 20 µg d'ARNs totaux sont prélevés, évaporés puis solubilisés dans une solution tampon dénaturante (4,5 mM Formamide déionisée / 0,4 mM Formaldéhyde / H₂O / 1X MOPS / 0,75 mg/ml Bromure d'éthidium / 4 % Tampon de chargement au Bleu de bromophénol). Chaque tube est passé au bain-marie sec pendant 15 minutes à +100°C puis refroidi avant le dépôt sur gel d'agarose. Un standard de Poids moléculaire ARN a été déposé dans les mêmes conditions. Après migration, le gel d'agarose est contrôlé au Trans-illuminateur UV afin de vérifier la présence des ARNs ribosomiques 18 et 28S. Le gel est ensuite rincé deux fois dans de l'eau puis une fois en solution tampon 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M Citrate de sodium, pH 7.0). Le gel d'agarose est ensuite mis en transfert par capillarité sur membrane de nylon (*Hybond-N+™, GE Healthcare Life Sciences*) en solution tampon 20X SSC pendant une nuit à température ambiante. Après transfert des ARNs sur la membrane, cette dernière est rincée en solution tampon 5X SSC puis trempée pendant 20 minutes en solution 0,05 M NaOH afin d'assurer la fixation des ARNs sur celle-ci. Un nouveau rinçage de la membrane est effectué en solution tampon 5X SSC.

La membrane est ensuite incubée en pré-hybridation à +65°C sous agitation pendant 3 heures. La solution de pré-hybridation, préchauffée 5 minutes à +100°C, a la composition suivante : Solution tampon 5X SSC / 1X DENHARD'T / 0,1 % SDS / 100 µg/µl ADN de sperme de saumon / H₂O.

Une sonde ADN (amplicon purifié) de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire (nommée CP2 1.14, positions 1260 à 1536 séquence bovine Y08829) est radiomarkée à l'aide d'un kit *Rediprim™ (GE Healthcare Life Sciences)* : 20 ng de sonde (préalablement dénaturée au bain-marie bouillant) sont incubés avec 2 µl de dCTP* (³²P) à 10 µCi/µl soit 20 µCi, pendant 30 minutes à +37°C. En fin d'incubation, le mélange est purifié par passage de fractions de 200 µl de solution tampon TE 1X (10 mM Tris/HCl pH 7.2, 1 mM EDTA) sur une colonne de SEPHADEX Fine G50. 1 µl de chaque fraction additionné de 3,5 ml de liquide scintillant est mesuré au compteur β à scintillation (Méthode *CERENKOV*). Seule la fraction la plus radiomarkée est utilisée. Le tampon d'hybridation est préparé (même composition que pour la solution de pré-hybridation) auquel on ajoute la sonde purifiée à la concentration de 1.10⁶ cpm/ml. L'hybridation de la sonde se fait une nuit à +65°C. En fin d'incubation, la solution d'hybridation contenant la sonde radiomarkée est éliminée. Deux lavages de la membrane par une solution tampon 4X SSC + 0,1% SDS préchauffé à +70°C puis deux lavages en solution tampon 2X SSC + 0,1% SDS sont réalisés.

En fin de lavage, la membrane est mise en exposition en cassette sous écran pendant 3 jours puis lue au Phosphorimageur *FLA3000 (FUJIFILM Life Science)*.

L'ARN ligase effectue une ligation de l'adaptateur 5' à l'extrémité 5' phosphate libre de l'ARN

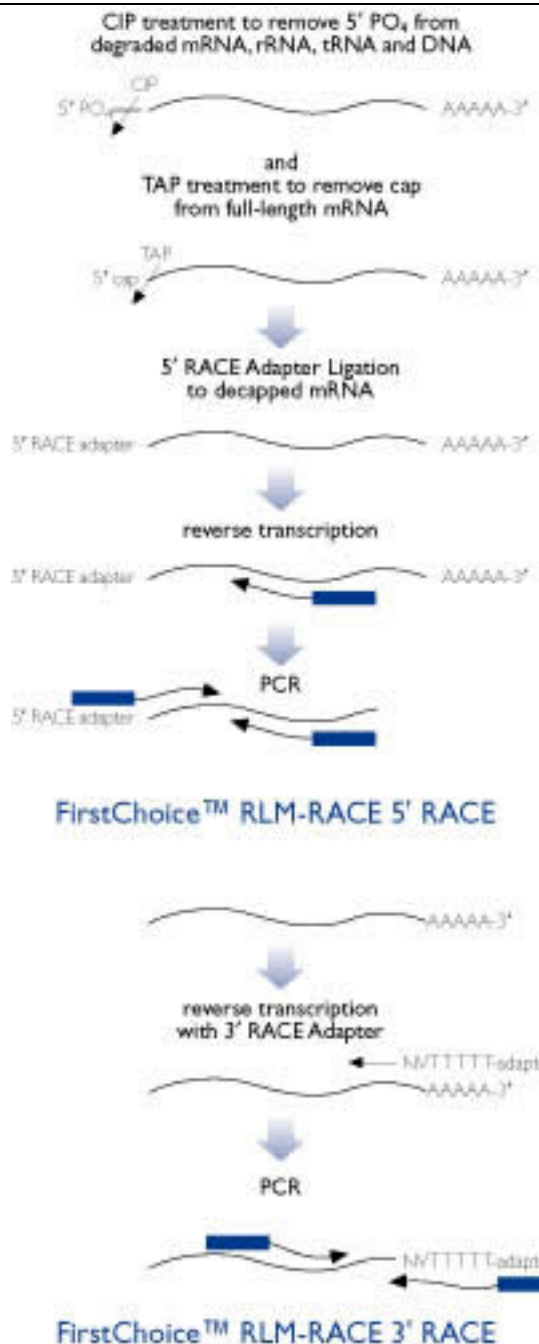


Figure 25 Schémas résumant les étapes de la technique de RLM-RACE 5' et 3' (Extrait du manuel du kit AMBION "First Choice™ RLM-RACE")

Le Kit est conçu pour amplifier l'ADNc uniquement à partir de l'ARNm coiffé de de grande longueur, produisant habituellement une bande unique après PCR. Ce kit est une amélioration majeure par rapport au protocole d'amplification rapide de base d'ADNc (RACE). La procédure RLM-RACE sélectionne uniquement l'ARNm de grande longueur - pas d'ARNr, d'ARNt ou d'ARN dégradé - et facilite le clonage de séquences à partir des extrémités 5' des messages.

Les ARNm sont sélectionnés en traitant les ARNs totaux ou polyA avec la phosphatase intestinale de veau (CIP) pour éliminer le 5'-phosphate de toutes les molécules qui contiennent des 5'-phosphates libres (ARN ribosomique, ARNm fragmenté, ARNt et ADN génomique contaminant). Les ARNm de grande longueur ne sont pas affectés. L'ARN est ensuite traité avec de la pyrophosphatase acide de tabac (TAP) pour éliminer la structure de coiffe de l'ARNm de longueur complète en laissant un 5'-monophosphate libre. Un adaptateur d'ARN synthétique est lié aux seules molécules d'ARN contenant un 5' phosphate libre. Une transcription inverse à amorçage aléatoire suivie d'une PCR nichée sont ensuite effectuées pour amplifier l'extrémité 5' de votre transcrite spécifique. Pour l'extrémité 3', une transcription inverse avec un adaptateur muni d'une séquence poly T est effectuée et une PCR nichée est réalisée afin d'amplifier l'extrémité 3' du transcrite recherché.

4. Amplification Rapide des extrémités d'ADNc (RACE)

L'amplification rapide d'extrémités d'ADN complémentaires est une technique basée sur la PCR afin d'obtenir la séquence des ARNs messagers entiers dans le cas où seule une séquence partielle d'ADNc est disponible. Les ADNc entiers synthétisés, sont sous-clonés, puis séquencés afin d'en connaître la séquence entière.

Les séquences 5' ou 3' non-traduites d'un ARN messager peuvent être obtenues par la technique de *RLM-RACE* (*RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of cDNA Ends*) (*FirstChoice™ RLM-RACE Kit, Ambion*). Cette méthode utilise une amorce Antisens capable de s'hybrider sur une séquence connue du messager et une amorce Sens (ou adaptateur) capable de se fixer sur l'extrémité désirée (voir *Figure 25*). L'ensemble d'un extrait d'ARNs totaux est préalablement déphosphorylé afin de permettre la ligation d'un adaptateur et sélectionner ainsi que les ARNm entiers qui seront clonés par la suite dans un vecteur plasmidique.

4.1 Préparation des ARNs

10 µg d'ARNs totaux sont mis en présence de 2 µl de tampon CIP 10x, 2 µl de phosphatase d'intestin de veau (CIP) (réactifs du kit *Ambion*) dans un volume total de 20 µl. Le mélange réactionnel est doucement homogénéisé puis incubé 1 h à +37°C. Cette étape permet de retirer les 5'-phosphates libres présents sur les acides nucléiques ne possédant pas la coiffe spécifique des ARNs messagers tels que les ARNs ribosomiques, les ARN de transfert, les messagers dégradés ou l'ADN génomique. La réaction est arrêtée et les ARN sont extraits au Phénol/Chloroforme par l'ajout de 15 µl de la solution d'acétate de sodium (kit *Ambion*), 115 µl d'eau et 150 µl de Phénol/Chloroforme préalablement saturé dans l'acétate de sodium 3 M pH 4.5. Après homogénéisation et centrifugation 5 min à température ambiante à 10000 rpm, la phase aqueuse (supérieure) est récupérée et complétée de 150 µl de Chloroforme avant d'être de nouveau homogénéisée et centrifugée. La phase aqueuse est récupérée, additionnée de 150 µl d'isopropanol et les tubes sont stockés sur glace pendant 10 min. Les échantillons sont centrifugés à 14000 rpm pendant 20 min, le surnageant est éliminé, le culot lavé avec 500 µl d'éthanol 70 % par centrifugation 5 min à 14000 rpm. Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot séché dans un concentrateur rotatif à vide (*Speed Vac, Savant*). Le culot est enfin suspendu dans 11 µl d'eau stérile. La coiffe des ARNs messagers est éliminée et remplacée par un 5'-monophosphate libre par un traitement à la pyrophosphatase. Pour cela, 5 µl des échantillons sont traités par 2 µl de pyrophosphatase acide de tabac (TAP), 1 µl de tampon TAP 10x additionné de 2 µl d'eau stérile. Le mélange est doucement homogénéisé et centrifugé avant d'être incubé 1 h à +37°C. Une incubation supplémentaire de 1 h à +37°C de 2 µl du mélange réactionnel précédent complété d'1 µl d'adaptateur 5'RACE (voir *Tableau 4*), 1 µl de tampon 10x RNA ligase, 5 UI de T4 RNA Ligase dans un volume final de 10 µl permet la liaison de l'adaptateur aux extrémités 5' des messagers possédant le phosphate libre à leur extrémité 5'.

4.2. Transcription inverse des ARNs messagers

2 µl des ARN liés à l'adaptateur sont transformés en ADNc par une incubation d'une heure à +42°C en présence d'un mix de dNTPs (10 %), du tampon de transcription 10x (10 %), d'un inhibiteur de RNase (5 %), de la transcriptase inverse M-MLV (1 %) et de 20 % d'amorces oligo(dT) 12-18 Mers dans un volume final de 20 µl.

Tableau 4 Séquences des amorces oligonucléotidiques du kit "FirstChoice™ RLM-RACE" (Ambion)

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce 5' ---> 3'
5' Adapter (45 bases)	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCCUUUGAUGAAA
5' Outer (24 bases)	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5' Inner (35 bases)	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
3' Adapter (44 bases)	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGT ₁₂ VN
3' Outer (23 bases)	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3' Inner (32 bases)	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG

4.3. PCR "nichée" pour 5' RLM-RACE (Voir Tableau 4)

Les ADNc obtenus servent ensuite de matrice pour une première réaction de PCR (Température d'élongation +60°C) avec l'amorce Sens « 5' RACE Outer Primer » issue du kit et une amorce Antisens spécifique du gène cible (10 µM) ((voir *Tableau 4*). Pour les longs fragments à amplifier, la Taq ADN polymérase décrite précédemment est remplacée par une autre (*DNA polymerase Taq® La, Takara*), permettant une haute fidélité et un travail sur des matrices riches en bases G-C. L'étape d'élongation à +72°C est paramétrée à 1 min par kilobase. Une PCR nichée est ensuite réalisée (modification de la PCR classique dans le but de réduire la quantité de produits non spécifiques consécutifs à la liaison des amorces à des sites inattendus). Elle est faite sur 1 µl des produits de la réaction précédente en présence de l'amorce Sens « 5' RACE Inner Primer » et d'une amorce Antisens spécifique du gène (10 µM) suivant le même programme de PCR que la réaction précédente. Les produits de PCR obtenus sont contrôlés dans un premier temps par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % en TBE 1X puis, après clonage en vecteur *pGEM®-T Easy*, par séquençage pour déterminer la séquence de la partie 5'.

De la même manière, le kit *RLM-RACE* peut être utilisé sans pré-traitement des ARNs totaux par les phosphatases afin d'amplifier l'extrémité 3' d'un transcrit en utilisant la technique 3' RACE. C'est une procédure plus aisée que la 5' RACE. Une amorce Adaptateur 3' liée à une séquence oligo(dT) est utilisée directement lors du processus de transcription inverse pour la synthèse d'ADNc.

5. Clonage (par TA Cloning) d'ADNc entiers en vecteur *pGEM®-T Easy*

Les produits issus de RACE sont insérés dans un vecteur plasmidique (*pGEM®-T Easy, Promega*) puis utilisé pour transformer des bactéries compétentes (*E. coli DH5α, Life Technologies, Thermofisher*) afin de produire ce fragment en grande quantité.

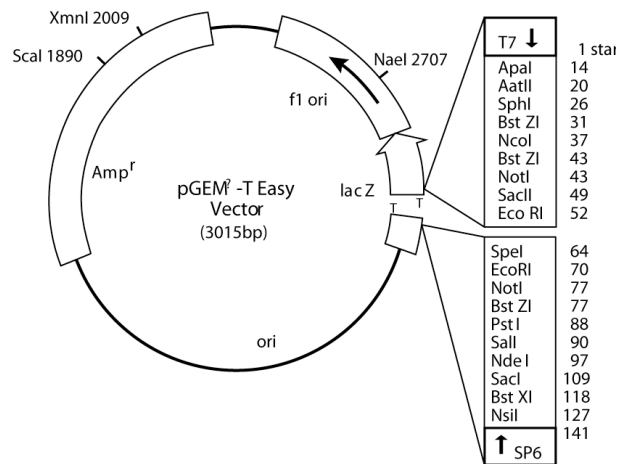
5.1. Le plasmide *pGEM®-T Easy*

Le choix de ce plasmide est conditionné par 4 paramètres principaux :

- Les amplicons destinés à être clonés subissent, à la fin de la PCR, une étape d'élongation terminale qui ajoute une désoxy-Adénosine aux extrémités 3' du fragment. Le plasmide *pGEM®-T Easy (Promega)* est un vecteur linéaire possédant une désoxy-Thymidine 3'-terminale à chaque extrémité (voir *Figures 26 et 27*). La complémentarité de ces deux bases permet ainsi le blocage, la recircularisation du plasmide et l'optimisation de l'insertion de produits PCR.
- Ce plasmide possède également le gène de la β-galactosidase qui se scinde lors de l'insertion du produit PCR au sein du plasmide. Il est donc possible de vérifier la correcte ligation de l'amplicon dans le vecteur en recherchant une activité β-galactosidase qui sera présente en absence d'amplicon et absente en présence d'amplicon.
- Ce vecteur est également choisi car il comporte au sein de sa séquence les promoteurs des ARN polymérases T7 et SP6 qui permettront de produire des sondes pour les expérimentations d'hybridation *in situ*.
- Ce plasmide contient un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline (β-lactamase), ce qui permet de sélectionner les colonies bactériennes ayant intégrées le vecteur et de conserver cette pression de sélection au cours de l'expérimentation.

5.2. Ligation de l'amplicon dans le plasmide

Afin que chaque plasmide incorpore un produit de PCR, ce dernier doit être trois fois plus concentré que le plasmide dans le mélange réactionnel (proportion 3 : 1). 50 ng de plasmide sont alors mis en présence de tampon de ligation 1X, de 3 UI de T4 DNA ligase, de la proportion adéquate de produit de PCR (ou 1 µl d'ADN contrôle) et d'un volume d'eau stérile nécessaire pour un volume de 10 µl final. Le contrôle négatif est réalisé en utilisant



pGEM[®] -T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
lacZ start codon	180
lac operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
lac operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Figure 26 *Détail des séquences référentes situées sur le plasmide pGEM[®]-T Easy (Promega)*

Le site de multiclonaage se situe entre les sites promoteurs T7 et SP6. L'insert positionné alors pourra être séquencé par les amorces correspondant au promoteur T7, au promoteur SP6, M13 Sens et/ou M13 Antisens.

le vecteur vide. Le mélange est recouvert d'une goutte d'huile pour éviter l'évaporation puis incubé 16 h à +15°C puis 20 min à +65°C afin de dénaturer l'enzyme.

5.3. Transformation bactérienne et culture sur milieu solide des bactéries

2 µl de produits de ligation sont incubés en présence de 50 µL de la solution mère de bactéries *E. coli* DH5α compétentes (*Life Technologies, Thermofisher*), mélangés doucement puis incubés 30 min à +4°C. Un choc thermique de 45 sec à +42°C puis de 2 min à +4°C permet la transformation bactérienne. Les bactéries sont ensuite incubées 1 h à 37°C sous agitation (200 tours/minute) dans 950 µl de milieu SOC (tryptone 2 %, extraits de levures 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM). 40 µl et 80 µl de chaque population bactérienne, sont déposés sur boîte de Pétri contenant un milieu Luria Bertoni solide et stérile (milieu LB : 1 % de peptone 140, NaCl 1 %, extraits de levures 0,5 %, pH 7.0) avec 1,5 % d'agar et 0.1 µg/ml d'ampicilline (*Sigma-Aldrich*). 800 µg de X-Gal (*Promega*) et 800 µg d'IPTG sont préalablement étalés sur les boîtes. Les cultures sont ensuite incubées la nuit à +37°C à l'obscurité puis conservées à +4°C afin d'accentuer la couleur des colonies bleues.

5.4. Contrôle de la présence de l'insert dans les colonies bactériennes par PCR

Le plasmide possède le gène *LacZ* qui code pour la β-galactosidase. Cette enzyme hydrolyse le X-gal qui libère ainsi sa partie indolique et forme un précipité bleu par oxydation. Lors de la ligation de l'amplicon dans le vecteur, le gène *LacZ* est interrompu et la β-galactosidase n'est pas produite. Les colonies qui ont intégré le plasmide avec l'amplicon seront donc blanches tandis que celles qui auront intégré un plasmide vide seront bleues. Seules les colonies ayant intégré le vecteur avec l'amplicon sont conservées dans la suite de l'expérimentation. Les colonies blanches sont prélevées par aspiration avec une pipette et un cône à filtre pour être mises en culture liquide. Lors de cette étape, le cône de la pipette contenant la colonie est trempé préalablement dans un tube contenant les réactifs de PCR. Une PCR est effectuée à l'aide d'amorces encerclant la zone du plasmide où l'amplicon s'est inséré (amorces M13 Sens et Antisens). Si aucun fragment de PCR n'est observé, cela signifie que le plasmide n'a pas été intégré dans les bactéries. Si le produit de PCR M13 obtenu fait 263 paires de bases, le plasmide qui s'est intégré aux bactéries ne contient pas l'amplicon. Enfin, si le produit PCR possède une taille qui correspond à la taille de l'amplicon d'origine additionné de 263 bases, alors le plasmide contenant l'amplicon est bien présent dans les bactéries de la colonie.

5.5. Mise en culture liquide et conservation des clones

Les colonies blanches issues de la culture solide sont prélevées par pipetage avec un cône à filtre et distribuées dans 5 ml de milieu LB contenant 0.1 µg/µl d'ampicilline. L'ensemble est incubé sur la nuit à +37°C sous agitation (200 tours/minute). Un tube témoin contenant le milieu non ensemencé est incubé dans les mêmes conditions. Après incubation, 500 µl de la solution bactérienne sont mélangés à 500 µl d'une solution aqueuse de glycérol 80 %, en cryotube. Ce dernier est congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C.

5.6. Purification des plasmides

Les plasmides restant de la culture sont extraits et purifiés à l'aide du kit *Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system (Promega)* selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les bactéries sont suspendues dans une solution iso-osmotique et détruites par un tampon de lyse contenant des protéases alcalines et des RNases. L'ADN libéré est immobilisé sur une colonne d'affinité tandis que les débris cellulaires sont éliminés. Après un double lavage à l'éthanol 70 %, l'ADN plasmidique est élué par de l'eau stérile et la concentration évaluée par spectrophotométrie d'absorbance à 260 nm.

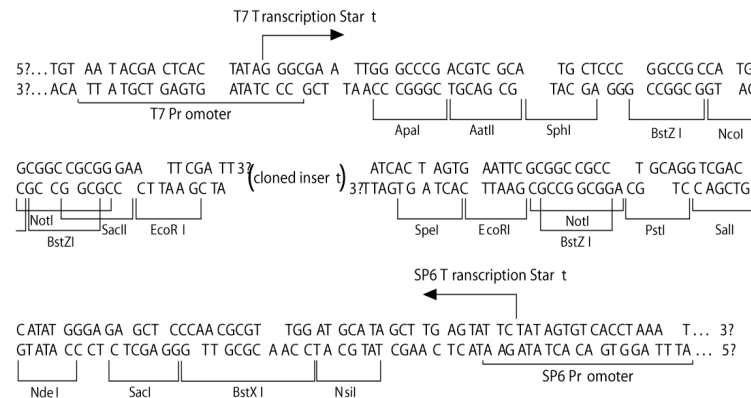


Figure 27 Séquence et site de multi-clonage du vecteur pGEM®-T Easy (Promega)

Le brin supérieur montré correspond à l'ARN synthétisé par l'ARN polymérase T7, le brin inférieur à l'ARN fabriqué par l'ARN polymérase SP6.

Le vecteur a été linéarisé par digestion par l'ER EcoRV en position 60 de la séquence. Une base T a été ajoutée aux deux extrémités 3'. Le site EcoRV ne pourra pas être masqué à partir de la ligation du vecteur avec l'insert.

Tableau 5 Amorces nucléotidiques utilisées pour la recherche des variants du transcrit de la 12-lipoxygénases identifiés dans l'utérus ovin

Nom de l'amorce	N° Accession Genbank / Espèce	Séquence 5' > 3' et positions sur la séquence Genbank	Taille Amplicon long (Pb)	Taille Amplicon court (Pb)
		Sens		
LCPYF8	Y08829 (<i>Bos taurus</i>)	1393 ACCACTAAGGAAGATGTGAC 1412	1058	320
		Antisens		
LCPYR7	CK728351 (<i>EST bovine</i>)	446 CATTGATTTACACGTTGCC 428		

LCPYF8, amorce Sens, est située sur l'exon 12 et LCPYR7, amorce Antisens, est positionnée sur la partie 3' UTR. Ces deux amorces ont été dessinées à partir de séquences bovines disponibles.

Remarque : EST = Etiquette bovine ("*Expressed Sequence Tags*"). Partie de séquence d'ADNc identifiée chez le bovin et non attribuée à un gène de l'espèce puisqu'incomplète.

5.7. Séquençage de l'insert

L'identité du fragment PCR, ou de l'ADNc inséré dans le vecteur purifié, est confirmée par séquençage. Ce séquençage est réalisé par le prestataire *Beckman Coulter Genomics* à partir de 5 µM d'amorces spécifiques (ici M13 Sens et Antisens) et de 1.5 µg de plasmide purifié.

6. Mise en évidence de variants d'épissage par PCR semi-quantitative

Les expérimentations de RACE précédentes permettent l'identification des séquences entières des transcrits de la 12-lipoxygénase ovine.

Un couple d'amorces oligonucléotidiques nous permettra par la suite de caractériser la présence des 2 formes de transcrits plus aisément et plus rapidement que par la technique de Northern blot.

L'identification complète de la séquence de chacun des deux transcrits isolés (RACE et sous-clonage en vecteur *pGEM®-T Easy*) nous a permis de définir des amorces oligonucléotidiques LCPYF8 (amorce Sens située sur l'exon 12) et LCPYR7 (amorce Antisens située sur la partie 3' UTR) (voir *Tableau 5*).

Ces amorces ont été utilisées en RT-PCR sur des extraits d'ARNs totaux provenant d'endomètres de 4 brebis gravides : 2 au 9ème jour, 2 au 14ème jour de gestation. Les protocoles de RT et de PCR sont identiques à ceux utilisés pour la recherche du type de 12-lipoxygénase (voir paragraphe III- 2. de ce chapitre B/ Matériels et Méthodes).

IV- Conception - Obtention des vecteurs d'expression en système eucaryote

Des tests préalables ont été réalisés pour la conception de vecteurs d'expression procaryote (*E. coli* Souche *BL21*). Le vecteur plasmidique pET-16b a été choisi. Ce dernier permet l'obtention de protéines recombinantes munies d'une étiquette poly-Histidine en partie C-Terminale. Les bactéries transformées ont permis l'obtention de protéines 12-lipoxygénases détectables par Western blot grâce à un anticorps polyclonal de lapin anti-HIS Tag. L'extraction de ces protéines n'a pas permis d'obtenir ces protéines sous forme soluble (données non montrées ici). Un changement de modèle de production s'est avéré nécessaire.

La nouvelle stratégie adoptée a donc été de tester une production en système eucaryote, partie expérimentale décrite ci-après. La conception de vecteurs pour une expression de chacune des formes de 12-lipoxygénase est envisagée en système eucaryote (Voir *Figure 28*). Ces constructions sont à prévoir pour **chacune des formes de la 12-lipoxygénase en les concevant respectivement avec et sans Tag Histidine**. Les constructions avec Tag Histidine sont faites à l'aide des plasmides obtenus préalablement lors des tests en système procaryote (vecteur pET-16b). Les constructions sans Tag Histidine sont conçues à partir des plasmides *pGEM®-T Easy*. L'objectif de cette stratégie est de permettre la purification grâce au Tag mais aussi de conserver une éventuelle activité biologique aux protéines recombinantes produites sans Tag Histidine, dans le cas où le Tag gênerait cette activité putative.

La stratégie expérimentale est la suivante :

- Amplification des deux formes de transcrits de la 12-lipoxygénase par PCR à l'aide d'amorces incluant un site de restriction NotI, présents dans le site de multiclonage du vecteur de surexpression (pCMVβ). Ces sites sont présents sur le vecteur et ils ne sont pas retrouvés dans les séquences des transcrits de la 12-lipoxygénase,
- Digestion du vecteur pCMVβ par les enzymes de restriction BssHII et NotI afin de linéariser le vecteur pCMVβ receveur et d'éliminer l'insert *LacZ* à remplacer par un des inserts 12-lipoxygénase,
- Digestion de chacun des amplicons à insérer par l'enzyme de restriction NotI,
- Ligation du vecteur linéarisé avec un des amplicons digérés,
- Transformation de bactéries *E. coli* DH5α avec chaque produit de ligation,

Tableau 6 Amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier les ADNc correspondant à la forme normale (LN10) et la forme courte (L4) de la 12-lipoxygénase ovine pour insertion en vecteur eucaryote pCMV β

Nom de l'Amorce	Séquence 5' → 3'	Matrice	Taille attendue Amplicon (Pb)
Construction eucaryote à insert LN10 AVEC TAG Histidine			
NotILN10+TAG3	5'-tattcaagcttggtaccGC↓GGCCGCCTTTAAGAAGGAGATA TACCATGGGC-3'	pET-16b LN10	2091
NotI-LN10-R3	5'-tattcaagcttggtaccGCGGCC↓GCTCAAATAGTGACG CTGTTCT-3'	Clone 22	
Construction eucaryote à insert LN10 SANS TAG Histidine			
NotILN10-TAG3	5'-tattcaagcttggtaccGC↓GGCCGC ATGGGCCGCTACCGCATCCT-3'	pGEM@- T easy LN10	2008
NotI-LN10-R3	5'-tattcaagcttggtaccGCGGCC↓GCTCAAATAGTGACG CTGTTCT-3'	Clone 03	
Construction eucaryote à insert L4 AVEC TAG Histidine			
NotIL4/LN10+TAG	5'-NNNNNNGC↓GGCCGCCTTTAAGAAGGAGATATACC ATGGGC	pET-16b L4 Clone 10	1998
NotI-L4-R	5'-NNNNNNGC↓GGCCGCTTAGGGGCTTCCCAGGTGGT		
Construction eucaryote à insert L4 SANS TAG Histidine			
NotIL4/LN10-TAG	5'-NNNNNNGC↓GGCCGCATGGGCCGCTACCGCATCCT	pGEM@- T easy L4 Clone 02	1915
NotI-L4-R	5'-NNNNNNGC↓GGCCGCTTAGGGGCTTCCCAGGTGGT		

Les matrices indiquent les constructions à partir desquelles les amplicons seront synthétisés par PCR en utilisant les amorces créées.

Les couples d'amorces pour la forme longue LN10 ont été définis en ajoutant des sites connus de restriction (non présents sur les plasmides matrices) selon la disposition suivante (le code couleur des amorces respecte cette disposition) :

5'-1/2 site EcoRV-site HINDIII-site KpnI-NotI-Début séquence insert LN10 (avec ou sans Tag)

Cette stratégie permet de conserver à l'amorce une structure linéaire sans risque de repliement

CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGC = Début de séquence codant pour le motif poly-HISTIDINE

TCAAATAGTGACGCTGTTCT = Fin de séquence codante du transcrit long

TTAGGGGCTTCCCAGGTGGT = Fin de séquence codante du transcrit court

- Sélection d'un clone par type de construction plasmidique (par PCR),
- Mise en culture liquide de chaque clone retenu,
- Préparation d'extraits plasmidiques,
- Envoi au séquençage pour confirmation de la séquence de chaque insert,
- Extraction des plasmides d'une culture liquide en grand volume de bactéries transformées correspondant aux clones choisis après séquençage.

1. Conception des amorces pour la synthèse des ADNc de chacun des transcrits de la 12-lipoxygénase ovine

Les deux transcrits respectifs (forme normale LN10 et forme courte L4) sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques incluant des sites NotI (voir *Tableau 6*).

Les amorces sont dessinées sur les séquences codantes des deux transcrits de la 12-lipoxygénase afin de créer des sites de coupure par l'enzyme de restriction NotI pour permettre l'insertion dans le vecteur d'expression pCMV β , remplaçant l'insert originel LACZ. Cette enzyme a été choisie car :

- présente sur le MCS (Multicloning site) du vecteur receveur pCMV β ,
- ce site de restriction n'est pas présent dans la séquence des ADNc à insérer.

Des bases NNNNNN ajoutées permettent de stabiliser l'ensemble de chaque séquence oligonucléotidique de façon à faciliter l'ancrage de l'enzyme de restriction sur l'amplicon à digérer. Ces amorces tiennent compte du sens de lecture dans le vecteur pCMV β . Les extrémités ainsi créées seront débordantes après digestion des amplicons par l'enzyme NotI.

Les divers couples d'amorces oligonucléotidiques permettent de concevoir 4 types de constructions plasmidiques en vecteur pCMV β : 1 vecteur avec insert LN10 AVEC Tag HIS, 1 vecteur avec insert LN10 SANS Tag HIS, 1 vecteur avec insert L4 AVEC Tag HIS, 1 vecteur avec insert L4 SANS Tag HIS. Nous avons fait ce choix pour chaque forme de 12-lipoxygénase à produire de façon à :

- disposer d'un moyen de purification des protéines recombinantes produites en cellules COS-7 grâce au Tag HIS,
- obtenir des protéines recombinantes sans Tag HIS, non destinées à la purification mais dont l'activité biologique (capacité de conversion de l'Acide arachidonique en 12-HETE) ne puisse pas être entravée par la présence du Tag, ce dernier pouvant avoir un encombrement stérique gênant cette activité.

2. Choix des matrices pour les amplifications

Les matrices sont les plasmides correspondant aux clones obtenus (voir *Tableau 6*) :

- en *pET-16b*, mis au point lors des tests préalables pour une surexpression en cellules procaryotes (*non montrés dans ce mémoire*). Ces matrices dotées de la séquence His Tag permettront l'obtention de protéines taguées Histidine en partie N-terminale.
- en *pGEM®-T Easy*, à utiliser pour l'obtention de protéines recombinantes à concevoir sans Tag HIS.

3. PCR pour la production des amplicons à insérer en vecteur pCMV β

L'amplification des deux formes de transcrits de la 12-lipoxygénase se fait par PCR à l'aide des amorces mentionnées dans le *Tableau 6*.

Les tailles d'amplicons attendues sont indiquées pour chaque construction. Les matrices utilisées sont indiquées également.

Une amplification par PCR à l'aide d'une Taq ADN polymérase Haute Fidélité (*Herculase II, Agilent Biotechnologies*) est effectuée (35 cycles, température d'hybridation des amorces à +60°C).

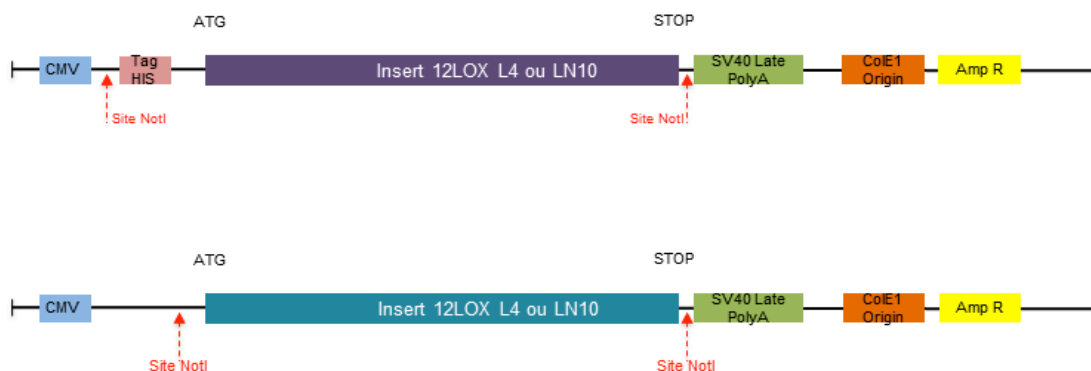


Figure 28 Schémas simplifiés des vecteurs pCMV 12-lipoxygénase pour chacun des ADNc insérés (Forme courte L4, Forme normale LN10)

Chaque insert est prévu avec Tag Histidine en amont (schéma du haut, boîte rose) ou sans Tag Histidine (Schéma du bas).

Tableau 7 Amorces nucléotidiques utilisées pour le tri des clones bactériens correspondant aux constructions de la forme courte L4 et de la forme normale LN10 de la 12-lipoxygénase en plasmide pCMV

Nom de l'amorce	Séquence 5' ----> 3'	Taille attendue de l'amplicon (Pb)
L4-LN10-postCMV	GACCAGCCACAGCTGCACGCGGTTG	942
M13 F	TGTAACGACGGCCAGT	

L'amorce Antisens "L4-LN10 Post-CMV" est située dans le premier tiers de l'insert sur chaque construction théorique pCMV L4,

L'amorce Sens M13 F est située en aval de l'insert.

Ces deux amorces permettent de nous confirmer la bonne orientation de l'insert (doublement digéré NotI) dans le vecteur pCMV (également digéré NotI)

4. Digestions enzymatiques

La digestion du vecteur pCMV β par les enzymes BssHII et NotI est effectuée en deux étapes successives : 12 μ g de vecteur sont digérés à +37°C pendant 1h20 en tampon TANGO™ (*ThermoFisher*) avec 50 UI d'enzyme NotI sous un volume final de 200 μ l en TE 1X. En fin d'incubation, 50 UI d'enzyme BssHII (*New England Biolabs*) sont ajoutés dans le milieu réactionnel (même tampon réactionnel pour les deux enzymes de restriction). L'incubation est poursuivie à +50°C pendant 1h20. L'ensemble du volume réactionnel, en fin de deuxième digestion, est additionné de tampon de chargement 6X *Loading Dye* (*ThermoFisher*) et de bromure d'éthidium. L'ensemble du digestat est ensuite réparti sur plusieurs puits à volume égal d'un gel d'agarose 1% . La migration du digestat se fait par électrophorèse en tampon TBE 1X. La bande d'agarose renfermant l'ADN correspondant au vecteur digéré, débarrassé de l'insert *Lac Z*, est détectée au Trans-illuminateur UV, découpée et purifiée à l'aide d'un kit de purification par colonne ("*WIZARD® SV Gel and PCR Clean up System*", *Promega*). Le fragment est élué par 40 à 50 μ l d'eau pure et sa concentration est évaluée par un dosage spectrophotométrique ($\lambda = 260$ nm).

Une digestion par l'enzyme NotI est effectuée sur 0,5 μ g de chacun des quatre amplicons produits pendant 1h30 à +37°C dans le tampon TANGO™ avec 50 UI d'enzyme (*ThermoFisher*) sous un volume final de 200 μ l en TE 1X. Les amplicons sont contrôlés sur gel d'agarose 1%.

Les fragments sont purifiés sur colonne, élués dans 40 à 50 μ l d'eau pure et leur concentration est mesurée par un dosage spectrophotométrique ($\lambda=260$ nm).

5. Ligation et transformation en bactéries *E. coli* DH5 α

Le protocole utilisé est le même que celui effectué pour les constructions plasmidiques en pGEM®-T Easy ou pET-16b On utilise des bactéries *E. coli* chimi-compétentes (*Subcloning Efficiency™ DH5 α Competent Cells*, *Life Technologies*, *ThermoFisher*).

La mise en culture liquide, la conservation des clones, la purification des plasmides et le séquençage des inserts sont des étapes respectant la même démarche expérimentale et selon les mêmes conditions opératoires.

6. Sélection d'un clone par type de construction en plasmide pCMV

Les clones bactériens obtenus après étalement des bactéries transformées et correspondant à chacune des constructions (L4 comme LN10, avec/sans Tag HIS) sont analysés par PCR sur colonie à l'aide d'amorces dont les séquences sont indiquées dans le *Tableau 7* (amorce Sens M13F, amorce Antisens L4-LN10-postCMV). L'amorce Antisens a été dessinée de façon à ne sélectionner que les clones dont l'insert est correctement orienté (critère de sélection = taille de l'amplicon de 942 pb), la digestion unique de l'amplicon par l'enzyme NotI à chaque extrémité ne permettant pas d'orienter l'insert.

Une amplification est effectuée sur chaque colonie bactérienne piquée en utilisant 1 UI de Taq ADN polymérase *Herculase II* (*Agilent Biotechnologies*), accompagnée de son tampon réactionnel, 250 nM de chacune des amorces, 250 μ M de chaque dNTP. Le programme de PCR est défini comme suit : Dénaturation initiale à +95°C pendant 5 minutes, 35 cycles correspondant aux 3 étapes (Dénaturation à +95°C pendant 30 secondes, Hybridation des amorces à +60°C pendant 30 secondes et Elongation à +72°C pendant 30 secondes), Elongation terminale à +72°C pendant 3 minutes puis une conservation des amplicons à +15°C.

Les amplicons obtenus sont analysés par migration sur gel d'agarose 1% en TBE 1X (Dépôts de 10 μ l d'amplicon avec 3 μ l de tampon de chargement 6X *Loading Dye* (*ThermoFisher*) et 1 μ l de bromure d'éthidium 10 mg/ml).

Le gel est visualisé au Trans-illuminateur UV. Les clones présentant une bande unique à 942 pb sont retenus : une culture liquide LB / Ampicilline 5 ml est effectuée à partir du clone bactérien piqué à l'origine sur la boîte d'étalement. L'incubation est réalisée sous agitation (220 tours/minute ou rpm) pendant 1 nuit à +37°C. Le lendemain, un cryotube de conservation du clone glycérolé est préparé (500 µl de culture liquide additionnée de 500 µl de Glycérol 80% stérile) puis stocké à -80°C. Le reste de chaque culture est destiné à une extraction de plasmide à l'aide du kit *WIZARD® Plus SV Miniprep DNA purification System (Promega)*.

La concentration des extraits de plasmides est évaluée par dosage spectrophotométrique ($\lambda = 260 \text{ nm}$) et un séquençage est effectué afin de s'assurer de la conformité de chacune des constructions attendues.

7. Digestion enzymatique de plasmides pCMV par l'enzyme ScaI

Les extraits plasmidiques correspondant aux clones retenus pour le séquençage sont contrôlés après digestion par l'enzyme ScaI, dans l'attente du retour des séquences. 800 ng de chaque extrait est mis en digestion avec 10 UI d'enzyme de restriction ScaI (*ThermoFisher*) en tampon réactionnel dédié dans un volume total de 10 µl. L'incubation est faite au bain-marie pendant 2 heures à +37°C.

Les digestats sont contrôlés sur gel d'agarose 1% par migration en tampon TBE 1X. La totalité du volume de digestat est déposée avec 3 µl de tampon de chargement et 1 µl de bromure d'éthidium 10 mg/ml. Le gel est visualisé au Trans-illuminateur UV.

8. Correction d'un plasmide par excision d'un insert surnuméraire : Utilisation de l'ER MluI

Cette même procédure de digestion est appliquée dans le cas d'un plasmide présentant deux inserts concaténés (information issue du séquençage) en utilisant une digestion par l'enzyme de restriction (ER) MluI (*ThermoFisher*). 10 UI d'enzyme sont utilisés pour digérer 1 µg d'extrait plasmidique le cas échéant. Un contrôle sur gel d'agarose 1 % est fait sur la totalité du digestat suivi d'une purification de la bande de vecteur digéré par colonne (Kit *SV gel and PCR clean-up System, Promega*). Une ligation par la T4 DNA Ligase permettra de recirculariser le plasmide, et une nouvelle transformation de bactéries *E. coli* DH5 α sera effectuée. Un étalement sur boîte LB Agar / Ampicilline suivi de l'analyse des colonies par PCR permettra de sélectionner un "clone réparé par excision de l'insert surnuméraire" selon la même procédure habituelle décrite jusqu'ici.

9. Correction d'un plasmide par extraction/remplacement d'une partie de séquence mutée

Dans le cas d'un plasmide présentant de multiples bases mutées dans une même partie de séquence, la stratégie diffère de la précédente par remplacement d'une partie de la séquence par une partie de séquence "saine". Une double-digestion BglII/MluI a été effectuée sur les plasmides présentant plusieurs mutations au sein de la séquence codante. La même opération a été effectuée sur le plasmide originel pGEM®-T Easy. Une ligation entre partie du vecteur pCMV et partie saine pGEM®-T Easy a été réalisée, suivie d'une transformation de bactéries *E. coli* DH5 α . La procédure d'analyse des transformants a suivi la stratégie classique de tri par PCR.

10. Correction d'une mutation unique par mutagenèse dirigée

Cette correction d'une base remplacée par une autre observée sur certaines constructions a été faite à l'aide d'un kit de mutagenèse dirigée "*Thermo Scientific Phusion Site-directed Mutagenesis Kit*" (*ThermoFisher*).

Le principe consiste à amplifier l'insert muté par PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques dont l'une présente la base corrigée. Les deux amorces sont positionnées "tête-bêche" sur la carte du vecteur. Une amplification est réalisée avec une Taq ADN polymérase haute fidélité.

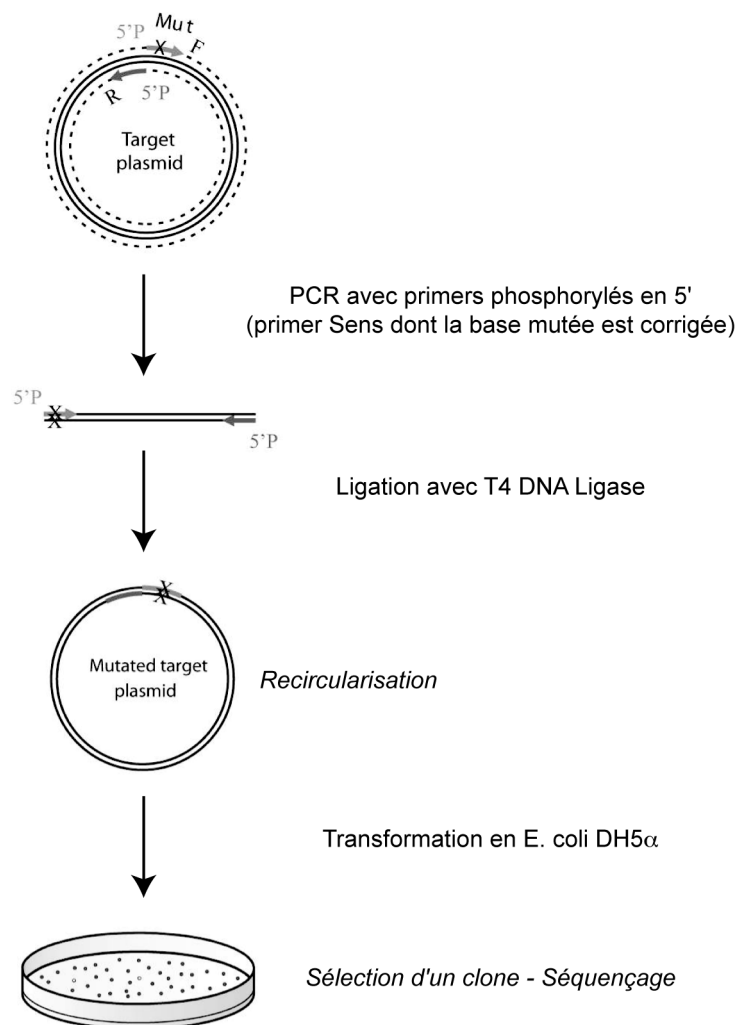


Figure 29 Schéma du principe de correction de la mutation des 2 constructions plasmidiques correspondant à la forme normale du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine (pCMV LN10 +TAG3, pCMV LN10-TAG3)

L'amorce Sens est définie avec correction de la base mutée. L'amorce Antisens est dessinée en position proche, de façon "tête bêche". Une PCR est réalisée avec une Taq *Phusion*[™] haute fidélité à l'aide des amorces phosphorylées en 5'. En fin de PCR, une ligation est réalisée à l'aide de la T4 DNA ligase suivie d'une transformation en bactérie. Des colonies sont sélectionnées sur LB Agar/Ampicilline via une PCR et un séquençage sur des extraits de plasmides correspondants est réalisé afin de s'assurer que la correction de la base mutée a bien été réalisée.

L'amplicon obtenu correspondant à la totalité du vecteur avec insert corrigé est ensuite lié par une T4 DNA Ligase. Des bactéries *E. coli* DH5 α . sont transformées et l'analyse des clones obtenus est faite par PCR.

Principe d'utilisation du kit (voir Figure 29) : Une amplification du plasmide muté est effectuée avec une Taq ADN polymérase haute fidélité et deux amorces oligonucléotidiques phosphorylées en extrémité 5'. L'amorce Sens est modifiée au niveau de la base erronée (T --> C). Les amorces utilisées (pCMV_LN10_F1 et pCMV_LN10_R2) sont décrites dans le *Tableau 8* ci-dessous.

Une ligation de l'amplicon modifié (soit le plasmide entier corrigé) est ensuite réalisée. Ce plasmide recircularisé est utilisé enfin pour la transformation de bactérie *E. coli* DH5 α .

Enfin, les transformants sont analysés par séquençage direct.

Pour chaque plasmide à corriger, 100 pg d'extrait plasmidique sont mis en présence d'une unité de Taq ADN polymérase *Phusion*TM, 500 nM de chaque amorce (pCMV_LN10_F1 et pCMV_LN10_R2, voir *Tableau 16*), du tampon *Phusion HF* (Haute Fidélité), sous un volume réactionnel de 50 μ l. Un programme d'amplification est appliqué de la manière suivante : 30 sec à +98°C en dénaturation initiale, puis 25 cycles selon la séquence comme suit : 10 sec à +98°C, 30 sec à +70°C et 3 min à +72°C. L'extension finale se déroule à +72°C pendant 10 min.

Une ligation est effectuée avec 50 ng de chaque amplicon avec une T4 DNA Ligase. L'incubation se fait 5 min à +25°C. Une transformation en bactéries *E. coli* DH5 α est enfin effectuée et un étalement sur boîte LB / ampicilline permet, après incubation une nuit à +37°C, de sélectionner 10 colonies pour chaque construction corrigée. Une culture liquide en LB / Ampicilline est faite pour chaque clone sélectionné et une extraction de plasmides, effectuée sur colonne de purification, permet de disposer de plasmides à envoyer au séquençage et à utiliser pour une transfection de cellules eucaryotes.

Tableau 8 Amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier les plasmides entiers pCMV des 2 constructions de la forme normale de la 12-lipoxygénase présentant la même mutation. Correction par PCR avec une Taq ADN polymérase haute fidélité (*Taq Phusion*TM).

Nom de l'Amorce	Séquence 5' → 3'	Remarques
pCMV LN10 F1	CCTCCTGAGCTCCTGGACCAGTCTGG	
pCMV LN10 R2	séquence originelle erronée GAGATGGTC T TCAAACGTGTTTACAC	T = Mutation à corriger
	séquence corrigée : GAGATGGTCC TCAAACGTGTTTACAC séquence corrigée inverse complémentaire : GTGTAAACACGTTTGA C GACCATCTC	C = Mutation corrigée dans la séquence inverse complémentaire de l'amorce Antisens

GAGATGGTCC TCAAACGTGTTTACAC = Zone de la séquence originelle dans les 2 inserts des constructions (pCMV_12LOX LN10+TAG3 et pCMV_12LOX LN10-TAG3) présentant la même mutation

pCMV_LN10+TAG3_G42/35 : Mutation en position 1467 C > T

pCMV_LN10-TAG3_H53/30 : Mutation en position 1384 C > T

L'amorce pCMV LN10 R2 défini tient compte de la correction sur la base erronée.

V- Transfection *in vitro* dans une lignée de cellules COS-7

La transfection est un processus permettant d'introduire de l'ADN exogène dans une cellule grâce à l'ouverture de pores transitoires dans la membrane plasmique par différents procédés ou agents de transfection. Une fois le plasmide d'intérêt transfecté dans la cellule, la machinerie cellulaire va permettre la transcription puis la traduction de la protéine correspondant à l'ADNc inséré dans le vecteur.

Les cellules COS-7 ont été choisies pour leur absence d'expression de Lipoxygénases endogènes évaluée préalablement par PCR.

1. Culture de cellules COS-7

Les cellules cryogénisées de lignée COS-7 (fibroblastes de rein de singe vert d'Afrique), commercialisées (*Public Health England, Sigma Aldrich®*), sont mises en culture de production après décongélation d'une ampoule de 3,5 millions de cellules/ml au Passage 5. Les cellules sont décongelées rapidement à +37°C, lavées avec une solution tampon de *D-PBS* contenant Calcium Ca²⁺/Magnésium Mg²⁺, centrifugées 5 min à 1000 Tours/minute et suspendues dans le milieu de culture *DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagles's Medium - F12, Sigma Aldrich®)* supplémenté de 10% de SVF (*Biosera*); 1,25% de Glutamine stabilisée (*PAN Biotech*) ; 1% d'Insuline-Transferrine-Sélénium (*ITS, Sigma Aldrich®*) ; 1% de Pénicilline-Streptomycine (*Biosera*) ; 0,1% de Nystatine ; 0,1% de Gentamicine (*Sigma Aldrich®*). La densité des cellules est mesurée par densité optique sur 1ml de suspension au spectrophotomètre ($\lambda = 480 \text{ nm}$) sur la base "1 DO = $10 \cdot 10^6$ cellules". La viabilité cellulaire de 90 à 95% est évaluée par une coloration au Bleu Trypan.

Les cellules sontensemencées à 0,15 DO par boîte de culture de diamètre 90 mm soit 56,7 cm² ($2 \cdot 10^6$ cellules pour 10 ml de milieu par boîte). Elles sont cultivées à +37°C en présence de 5 % de CO₂ dans l'air. Les cellules sont observées toutes les 24 heures jusqu'à confluence d'environ 90%, obtenue après 4 jours de culture. Les cellules sont lavées en *D-PBS* sans calcium ni magnésium, détachées et isolées par trypsination (*TrypLE Express™, Life Technologie, Thermofisher*) puis culotées par centrifugation douce à 1000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont remises en suspension en solution tampon de *D-PBS* avec Ca²⁺ et Mg²⁺. La DO de la suspension est déterminée au spectrophotomètre ($\lambda = 480 \text{ nm}$). Après centrifugation, 0,5 DO ou 1 DO sont cryogénisées dans 1 ml de milieu cryoprotecteur (10% DMSO + 90% SVF), par congélation progressive à -80°C en boîte de cryogénéisation (*NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container*) contenant de l'isopropanol (diminution de la température par paliers d'environ -1°C/minute). Un stock homogène de cellules cryogénisées est conservé en azote liquide.

2. Transfection de cellules COS-7

Les transfections sont réalisées sur cellules adhérentes à l'aide d'un agent lipofectant (*X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent™, Roche*) selon les recommandations du fournisseur validées et optimisées sur les cultures cellulaires développées au laboratoire. Les cellules COS-7, remises en culture à partir d'un cryotube au passage 8, sont cultivées en milieu *DMEM-F12* supplémenté tel que décrit au paragraphe 1. Les cultures sont menées sur différents supports en plaques de culture (24, 12 ou 6 puits) ou en boîtes de 90 mm de diamètre en fonction de l'analyse prévue ultérieurement. Les ensemencements sont réalisés en respectant la densité cellulaire souhaitée et le rapport de surface de culture afin d'obtenir des cellules à 70-80% de recouvrement en 24 heures (pour exemple : 0.15 DO/8,5 cm²).

Les cellules sont cultivées en absence de sérum pendant 2 heures avant la transfection. La solution de transfection est réalisée dans du milieu *Opti-MEM®* préchauffé à +37°C par addition du plasmide puis de l'agent transfectant. Après agitation douce, le mélange est pré-

incubé 30 min à +37°C avant le dépôt en gouttelettes sur le tapis cellulaire conditionné en milieu *DMEM-F12* seul non supplémenté.

Le rapport quantité (μg) de plasmide / volume (μl) de transfectant / volume (μl) de milieu *Opti-MEM*[®] (*Life Technologies, Thermofisher*), le nombre de cellules par type de boîte de culture, volume final de milieu de culture ont été testés et définis pour un taux de transfection transitoire optimal à 24 et 48 heures.

Le rapport 2 μg de DNA/4 μl de transfectant / 200 μl de mixte / 2 ml final de milieu / 8,5 cm² (diamètre 35 mm) a été adopté dans toutes les expérimentations en respectant ces conditions en fonction de la surface des boîtes de culture. Ces mêmes conditions opératoires ont été respectées pour les transfections suivantes :

- un plasmide *pGFPmax*[™] (3.3 Kb – *Amaxa, Nucleofactor*[®] *Technology, Lonza*) pour visualiser par fluorescence la population cellulaire transfectée, et évaluer ainsi la transfectabilité des cellules,
- Les plasmides avec ou sans Tag Histidine des deux formes de 12-lipoxygénase,
- un plasmide *pCMV β* (*Novagen*), à l'origine des constructions *pCMV 12LOX* comme contrôle de transfection.

Les cellules transfectées sont cultivées 24 heures sans changement de milieu

3. Récupération des cellules à l'issue de la transfection

Après 24 heures de transfection, les milieux sont éliminés. Les cellules sont trypsinées (*TrypLE Express*[™], *Life Technologies, Thermofisher*), lavées en *D-PBS* sans calcium ni magnésium, culottées par centrifugation douce à 1000 Tours/minute pendant 15 minutes à température ambiante. Les surnageants sont éliminés et les culots cellulaires congelés dans l'azote liquide. Les tubes sont stockés à -80°C en attente de leur exploitation (recherche des protéines par Western blot, Extraction des protéines et purifications sur colonnes de chromatographie d'affinité...).

Les cellules transfectées avec le plasmide Contrôle *pmaxGFP*[™] (*Amaxa Nucleofactor*[®] *Technology, Lonza*), sont observées au microscope inversé en fluorescence (*Axiovert 35 M, Zeiss*) afin de contrôler la transfectabilité des cellules.

Les cellules cultivées sur lamelles (2,9 cm²) (diamètre 12 mm) en vue d'une analyse cytochimique, et transfectées respectivement avec les plasmides *pCMV 12LOX*, sont rincées en solution tampon *D-PBS* avec calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}), fixées en solution de Paraformaldéhyde 4% dans du *PBS* pendant 20 minutes. Après 2 rinçages en solution tampon de *D-PBS* avec calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}), les plaques sont stockées à +4°C en attente de leur analyse par immunocytochimie.

VI - Immunocytochimie en fluorescence

Les immunocytochimies sont menées sur les cellules transfectées avec les quatre plasmides correspondant respectivement aux formes courte L4 et normale LN10 de la 12-lipoxygénase ovine, munies ou non d'un Tag HISTIDINE.

Les cellules cultivées sur lamelles, et transfectées pendant 24 heures avec 1 μg de plasmide se déclinent comme suit :

- Cellules transfectées avec *pCMV 12LOX L4* avec Tag Histidine,
- Cellules transfectées avec *pCMV 12LOX L4* sans Tag Histidine,
- Cellules transfectées avec *pCMV 12LOX LN10* avec Tag Histidine,
- Cellules transfectées avec *pCMV 12LOX LN10* sans Tag Histidine.

Tableau 9 Anticorps primaires utilisés pour l'ensemble des Western blots effectués sur tissus ovins et cellules COS-7 transfectées

Protéine	Référence Anticorps	Type d'Immunoglobulines	Organisme de production	Concentration d'utilisation	Origine
12-lipoxygénase forme courte L4	L345	Immunoglobulines totales polyclonales	Lapin	Dilution sérum entier au 1/500 ^{ème}	Laboratoire
	L345 <i>Sulfolink</i> ®	IgG purifiées spécifiques du peptide L4 (CP18)	Lapin	0,5µg/ml	Laboratoire
	L345 <i>HiTrap</i> ™ NHS <i>activated HP</i>	IgG purifiées spécifiques du peptide L4 (CP18)	Lapin	0,5µg/ml	Laboratoire
12-lipoxygénase forme normale LN10	L347	Immunoglobulines totales polyclonales	Lapin	Dilution sérum entier au 1/500 ^{ème}	Laboratoire
	L347 <i>Sulfolink</i> ®	IgG purifiées spécifiques du peptide LN10 (HC17)	Lapin	0,5µg/ml	Laboratoire
	L347 <i>HiTrap</i> ™ NHS <i>activated HP</i>	IgG purifiées spécifiques du peptide LN10 (HC17)	Lapin	0,5µg/ml	Laboratoire
	L347 <i>Protéine A</i>	IgG totales purifiées	Lapin	12µg/ml	Laboratoire
Tag 6X Histidine	2365	IgG totales purifiées	Lapin	Dilution au 1/1000 ^{ème}	<i>Cell Signaling Technology</i> ® (Ozyme)
Actine β	A5441	IgG1 monoclonales Ascite (clone AC-15)	Souris	Dilution au 1/2000 ^{ème}	<i>Sigma Aldrich</i> ®

Remarque : Les sérums de lapins obtenus au laboratoire correspondent à la prise de sang N°5 (soit après la 6^{ème} injection). Ils sont utilisés sur les extraits de protéines de cellules lumineales ovines, de COS-7 (surexpression en eucaryotes), de tissus ovins (cornée...). L'anticorps anti-His Tag est surtout utilisé sur les extraits de protéines surexprimées en procaryotes et pour la détection de protéines taguées dans les fractions de purification obtenues par HPLC. L'anticorps anti-Actine β est utilisé pour la standardisation des extraits protéiques de cellules lumineales ovines.

Les anticorps primaires utilisés sont indiqués dans le *Tableau 9* :

- L'immunsérum entier de lapin anti-peptide L4 L345 PS5 dilué au 1/500^{ème} sur les clones L4, et ses versions purifiées par chromatographies d'affinité (*Sulfolink®*, *HiTrap™ NHS activated HP*) utilisées à la concentration finale de 0,5 µg/ml,
- L'immunsérum entier de lapin anti-peptide LN10 L347 PS5 dilué au 1/500^{ème} sur les clones LN10, et ses versions purifiées par chromatographies d'affinité (*Sulfolink®*, *HiTrap™ NHS activated HP*) utilisées à la concentration finale de 0,5 µg/ml, ou Protéine A à la concentration de 12 µg/ml),
- L'anticorps polyclonal de lapin anti-His Tag (*Cell Signaling technologies®*, *Ozyme*) dilué au 1/1000^{ème} sur les clones munis d'un Tag,
- L'anticorps monoclonal de souris anti-Actine β (*Sigma Aldrich®*).

Chaque anticorps primaire est dilué dans une solution tampon 0,1 M phosphate pH 7.4 contenant 2 % de BSA, du sérum normal d'âne (dilution au 1/100^{ème}) et de la saponine à 0,05 %. L'incubation a lieu pendant 2 heures à température ambiante. L'anticorps secondaire, anticorps anti-immunoglobulines de lapin fabriqué chez l'âne et couplé à un fluorophore Alexa 488 vert (*Jackson Immunoresearch Laboratories inc.*, *Interchim*), est dilué au 1/200^{ème} dans une solution tampon 0,1 M phosphate pH 7.4 contenant 2 % de BSA. L'incubation a lieu pendant 1 heure à l'obscurité à température ambiante. Les quatre lavages intermédiaires de 10 minutes entre les anticorps primaire et secondaire se font à température ambiante en solution tampon 0,1 M phosphate pH 7.4 contenant 0,2 % de BSA.

Suite à l'incubation avec l'anticorps secondaire, les lamelles sont lavées une première fois pendant 10 minutes dans une solution tampon 0,1 M phosphate pH 7.4 contenant 0,2 % de BSA. Le deuxième lavage est réalisé en solution tampon 0,1 M phosphate pH 7.4 contenant 0,2 % de BSA et de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, marqueur nucléaire) (*Sigma Aldrich®*) à la concentration finale de 0,5 µg/ml. Les lamelles sont à nouveau lavées par deux bains de solution tampon 0,1 M phosphate pH 7.4 contenant 0,2 % de BSA.

Chacune est ensuite récupérée et déposée sur une lame de microscopie multipuits en verre et montée entre lame et lamelle avec une solution glycérolée de 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane ou TED (*Sigma Aldrich®*) puis lutée au vernis à ongle.

L'observation est réalisée sur un microscope à fluorescence *Olympus BX51* équipé d'une caméra *DP50* et d'un logiciel d'acquisition numérique de l'image. Les images sont traitées par les logiciels de traitement d'images (*Adobe™ Photoshop®*), sélectionnées et mises en page (*Adobe® Illustrator®*, *Microsoft™ Office PowerPoint®*).

VII- Western blot

1. Préparation des échantillons (cellules ovines, cellules COS-7)

Les cellules lumineuses ovines grattées comme les cellules COS-7 transfectées, sont lysées par sonication (3 secondes) à froid (+4°C) dans une solution tampon (0,02 M Tris/HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl), à laquelle sont ajoutés des inhibiteurs de protéases et un détergent :

- 16 mM/ml de (3-((3-cholamidopropyl) diméthylammonio)-1-propanesulfonate) (ou CHAPS),
- 0,15 µg/ml de benzamidine-HCl,
- 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF),
- 10 µg/ml d'inhibiteur trypsique de soja,
- 5 µg/ml de leupeptine,
- 10 µg/ml d'aprotinine.

Les inhibiteurs de protéases sont ajoutés au tampon de lyse afin de prévenir la dégradation des protéines extraites par des protéases endogènes. Les tissus ovins (cornées) subissent un broyage préalablement avec une tige *Polytron® (Kinematica)* dans la même solution d'extraction.

Dans tous les cas, les homogénats sont centrifugés 10 minutes à 15000 tours/minute à +4°C et la concentration protéique est évaluée par un dosage colorimétrique ($\lambda = 595 \text{ nm}$) selon la méthode de *Bradford* (*Biorad Protein Assay*[™], *Biorad*). Une gamme de BSA en solution aqueuse est utilisée comme gamme standard. Chaque échantillon subit une dénaturation des protéines par addition de tampon de *Laemmli 4X* (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 % Glycérol, 1 % LDS (Lithium Dodecyl Sulfate) et 0.005% Bleu de Bromophénol), passage des tubes à +100°C pendant 8 minutes et refroidissement avant dépôt sur Gel SDS-PAGE.

2. Séroneutralisation des immunosérums de lapins par le sérum normal de brebis

Les immunosérums de lapin utilisés (voir *Tableau 10*) sont préalablement mis en contact du sérum normal de brebis afin de neutraliser les composants qui pourrait induire du bruit de fond sur les membranes, en particulier celles concernant les extraits de cellules lumineales ovines. Une incubation préalable est réalisée pendant 1h30 à +37°C pour chaque immunosérum (10 μl dans 1 ml de tampon TBS / BSA 2 % / 0,2 % Tween et 1 ml de sérum Normal de brebis). Au terme de l'incubation, 3 ml de tampon TBS / BSA 2 % / 0,2 % Tween pré-incubés à +37°C sont ajoutés avant la mise en contact avec la membrane en PVDF.

3. Immunoneutralisation des immunosérums de lapins par les peptides respectifs

Les immunosérums de lapins utilisés sont préalablement mis en contact avec le peptide respectif contre lequel chacun est dirigé pour la mise en évidence de la spécificité des sérums utilisés. Une incubation préalable est réalisée pendant 1h30 à +37°C pour chaque immunosérum (10 μl dans 1 ml de tampon TBS / BSA 2 % / 0,2 % Tween, 60 μg de peptide correspondant et 1 ml de sérum normal de brebis). La composition du tampon TBS 1X utilisé pour les incubations est la suivante : 50 mM Tris/HCl, pH 7.6 et 150 mM NaCl.

Au terme de l'incubation, 3 ml de tampon TBS / BSA 2 % / 0,2 % Tween pré-incubés à +37°C sont ajoutés avant la mise en contact avec la membrane de PVDF.

4. Electrophorèse sur gel, transfert sur membrane et immunoblot

20 μg des protéines totales de chaque échantillon tissulaire ou 10 μg d'extrait de protéines totale de cellules COS-7 transfectées sont ensuite séparés sur un gel pré-coulé 4-15 % ou 10 % de polyacrylamide par *SDS-PAGE* ("*Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*") (*Biorad*), à intensité constante de 10 mA / gel en tampon de migration TGS 1X (25 mM Tris / 0,192 M Glycine / 0,1 % SDS pH 8.3), puis électro-transférés en système semi-sec *Transblot® Turbo*[™] (*Biorad*) pendant 7 min à 1,3 A et 25 V sur une membrane *Transblot® Turbo*[™] PVDF (*Biorad*) en présence de tampon de transfert dédié (*Transblot® Turbo*[™] *Transfer Buffer* avec éthanol). En sortie de transfert, la membrane est rincée en tampon TBS 1X / Tween 0,1% puis mise en saturation la nuit à +4°C dans un tampon bloquant (50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2 % de Tween 20 et 2 % de BSA (pH 7.5)).

Elle est ensuite incubée pendant 2 h à température ambiante dans la même solution tampon en présence d'anticorps primaire (Immunosérum entier ou purifié anti-peptide 12LOX L4 ou LN10 ou Anticorps anti-HIS Tag ou Anticorps anti-Actine B) (voir *Tableau 10*). Les anti-peptides sont séroneutralisés préalablement par du sérum normal de brebis (voir paragraphe 2.). En fin d'incubation d'anticorps primaire, la membrane est lavée deux fois 10 minutes en solution tampon TBS / BSA 2% / Tween 0,2 % puis deux fois 10 minutes en solution tampon TBS / Tween 0,1 %.

La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure à température ambiante à l'obscurité avec un anticorps d'âne anti-immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP ou *HorseRadish Peroxidase*) (*Jackson ImmunoResearch*, *Interchim*) dilué au 1/20000^{ème} dans le tampon TBS / Tween 0,1 %. Des contrôles négatifs sont réalisés : (1) L'anticorps primaire est omis mais l'anticorps secondaire conservé afin de valider la spécificité des signaux observés,

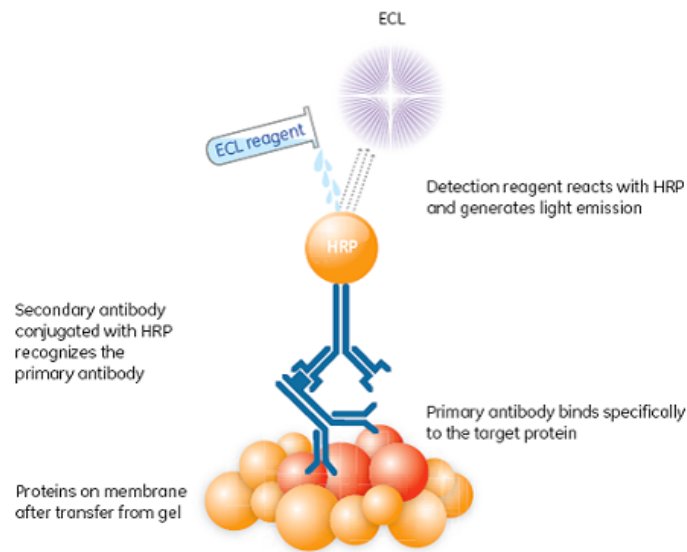


Figure 30 Principe de réaction du kit "ECL2 Western Blot Detection" (Pierce®, Thermofisher)

Le substrat Thermo Scientific™ Pierce® ECL2 Western Blotting est un substrat chimioluminescent à base d'acridane hautement sensible, non radioactif, pour la détection de la peroxydase de raifort (HRP) sur les immunoblots. Pierce® ECL2 Western Blotting Substrate permet la détection à l'échelle du picogramme de l'antigène en convertissant le substrat en intermédiaires d'ester d'acridinium par HRP et peroxyde. La réaction des intermédiaires d'ester d'acridinium avec le peroxyde produit une chimioluminescence prolongée, qui peut être visualisée un système d'imagerie par caméra CCD.

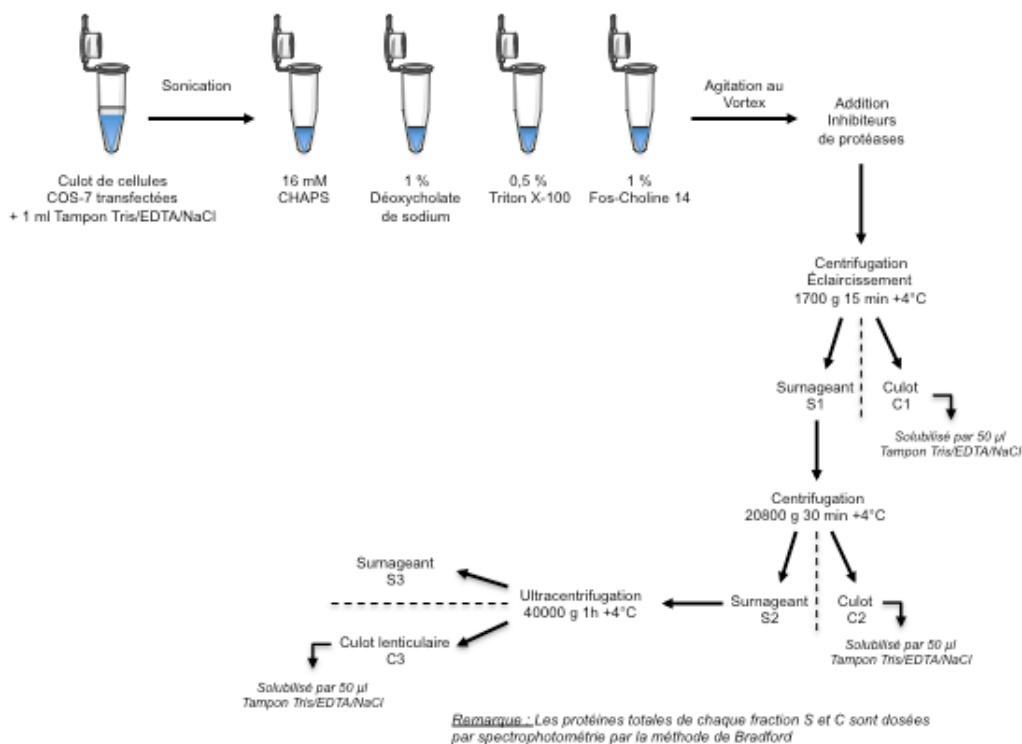


Figure 31 Procédure d'extraction des protéines recombinantes de cellules COS-7 transfectées

(2) Un test d'immunoneutralisation des immunosérums par les peptides spécifiques est effectué préalablement à l'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire.

Le signal immunoréactionnel est obtenu par les réactifs du kit "ECL2 Western Blot Detection" (Pierce®, Thermofisher) (voir Figure 30). Le signal est visualisé par la caméra CCD LAS1000+ (Fujifilm Life Sciences) et analysé par le logiciel Advance Image Data Analyser™ (Raytest). Le poids moléculaire des protéines est évalué à partir du marqueur de poids moléculaire HyperPAGE Prestained Protein Marker, 10 à 190 KDa (Bioline Meridian Biosciences) intégré parmi les échantillons.

VIII- Extraction des protéines recombinantes

Nous disposons d'un modèle cellulaire capable de produire des protéines recombinantes spécifiques des formes normale (LN10) et courte (L4) de la 12-lipoxygénase ovine. Ces protéines surexprimées en cellules COS-7 doivent être extraites et solubilisées afin de faciliter leur purification par Chromatographie d'affinité.

Les premières analyses effectuées jusqu'ici par western blot ont consisté à travailler directement sur des extraits entiers de protéines de cellules COS-7 ou de cellules épithéliales luminales d'utérus ovin. Afin d'optimiser la purification d'extraits totaux de cellules COS-7, nous devons nous assurer au préalable de leur solubilité en phase aqueuse. Pour ce faire, les conditions d'extraction en présence de différents détergents doivent être mises au point.

Divers détergents sont classiquement utilisés afin de permettre une meilleure solubilisation des protéines cellulaires. Selon leur classe, les détergents ont des modes d'action différents mais tous participent à une optimisation de la répartition des protéines extraites sous forme micellaire, favorisant ainsi leur solubilité en phase aqueuse.

Quatre types de détergents ont été choisis ici :

- Le CHAPS, ou 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate, détergent non dénaturant favorisant la solubilisation des protéines membranaires. C'est le détergent utilisé pour les extractions de protéines totales dans nos premiers tests de western blot.
- Le DOC, ou Déoxycholate de sodium, détergent anionique, utile pour l'extraction des récepteurs membranaires en particulier,
- Le TX-100, ou Triton X-100, surfactant non-ionique et émulsifiant, non dénaturant, couramment utilisé dans les applications biochimiques pour la solubilisation des protéines,
- La FC-14, ou Fos-Choline-14, Détergent utilisé pour la solubilisation des protéines membranaires.

Des culots de cellules COS-7 transfectées respectivement pour chacune des formes de 12-lipoxygénase ovine (L4, LN10) sont extraits par sonication dans 1 ml de solution tampon (0,02 M Tris/HCl pH 7.6 avec 5 mM EDTA et 150 mM NaCl) en absence d'inhibiteur de protéase et de détergent (voir Figure 31).

Chaque extrait est divisé en 4 aliquotes de mêmes volumes. Chaque détergent est ajouté respectivement dans les différents aliquotes (16 mM CHAPS, ou 1 % DOC ou 0,5 % TX-100 ou 1% FC-14). Chaque tube est ensuite passé successivement au vortex puis sur glace, plusieurs fois de suite. Des inhibiteurs de protéases sont ajoutés dans chaque extrait selon les quantités décrites dans ce chapitre au *paragraphe VII- 1*. (Benzamidine, Leupeptine, Inhibiteur trypsique de soja, PMSF, Aprotinine).

Une première centrifugation d'éclaircissement est réalisée à 2000 tours/min pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant S1 est séparé du culot C1.

Une seconde centrifugation est réalisée à partir du surnageant S1 à 14000 tours/min pendant 30 minutes à +4°C. Le surnageant S2 est séparé du culot C2.

Enfin, une ultracentrifugation est effectuée à partir du surnageant S2 à 40000 g pendant 1 heure à +4°C. Le surnageant S3 est séparé du culot lenticulaire C3.

Chaque culot ainsi obtenu (C1, C2, C3) est solubilisé dans 50 µl de solution tampon (Tris/HCl 0,02 M pH 7,6 avec EDTA 5 mM et NaCl 150 mM). 50 µl de chaque surnageant sont prélevés individuellement. Une évaluation de la concentration en protéines totales de chaque fraction (S, C) est faite par un dosage colorimétrique selon la méthode de Bradford ($\lambda = 595 \text{ nm}$).

IX- Purification des protéines recombinantes : Chromatographie d'affinité His Tag

Des cellules COS-7 transfectées 24h avec chaque plasmide, codant pour une protéine taguée Histidine, sont extraites en tampon 50 mM Phosphate pH 7.4, 300 mM NaCl et 32mM CHAPS (Sonication d'un culot de cellules issu de 9 boîtes de culture de diamètre 90 mm pour chaque type de transfection, centrifugation à 10000 Tours/minute pendant 20 minutes à +4°C puis récupération de chaque surnageant respectif).

La purification se fait à l'aide de colonnes de chromatographie d'affinité *HisPur*TM (*Pierce*®, *ThermoFisher*) dont la matrice de résine d'agarose comporte des groupements d'ions cobalt (à forte affinité pour l'Histidine des Tags protéiques). Le protocole de purification suit les indications données par le fabricant :

- Tampon d'équilibre/lavage à 50mM Phosphate de sodium, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH 7.4,
- Tampon d'élution à 50mM Phosphate de sodium, 300mM NaCl, 150mM imidazole, pH 7.4.

Pour chaque extrait de protéines issues d'une production en eucaryote, le surnageant de centrifugation est ensuite dilué en conditions non dénaturantes dans le même tampon puis injecté dans l'analyseur HPLC (*Waters*). Un passage du tampon additionné de 150mM d'imidazole permet l'élution des protéines taguées Histidine par rupture de la liaison entre le groupement 10X Histidine et les ions Cobalt de la matrice.

Les différentes fractions de 2 ml sont détectées en UV et isolées grâce à un collecteur de fractions. L'analyse des fractions est réalisée par Western blot. Les immunosérums anti-peptides ou l'anticorps anti-His Tag sont utilisés en tant qu'anticorps primaires selon le protocole décrit au *paragraphe VII* de ce chapitre.

X- Mesure d'activité de conversion de l'A.A. en 12-HETE

L'activité biologique des protéines recombinantes est mesurée par la conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE des extraits de protéines issues de cellules COS-7 transfectées avec les plasmides pCMV 12LOX pour chacune des formes de l'enzyme, avec ou sans Tag Histidine. La composition de la solution tampon d'activité utilisée est inspirée de celle utilisée pour les expérimentations (*Izumi et al.* 1990). Cette solution a la composition suivante : 0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM glutathion, pH 7.4.

La présence de Glutathion sous forme réduite dans le milieu réactionnel empêche la formation des produits les plus polaires. Ainsi, le 12-HETE reste le seul métabolite issu de l'activité de la 12-lipoxygénase sur son substrat (acide arachidonique) présent dans le milieu réactionnel (*Chang et al.*, 1982). De la même façon, l'activité enzymatique de conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE par la 12-lipoxygénase est dépendante du pH du milieu réactionnel, l'enzyme étant en fraction soluble cytosolique ou liée aux membranes cellulaires (*Lagarde et al.*, 1984).

Les cellules COS-7, après 24 heures de transfection, sont trypsinées, récupérées en microtubes et lavées en *D-PBS* sans calcium ni magnésium, centrifugées pendant 15 minutes à 2000 tours/minute (rpm) à +4°C. Le surnageant est éliminé et la solution tampon d'activité est ajoutée au culot de cellules (1 ml de tampon pour un culot de cellules équivalent à une boîte diamètre 90 mm soit 1,1 DO à $\lambda = 490 \text{ nm}$). Les cellules sont alors

remises en suspension dans le tampon par pipetages/refoulements et soniquées quelques secondes.

L'extrait obtenu est dit "extrait de protéines totales" pour chaque condition testée (L4+Tag, L4-Tag, LN10+Tag3, LN10-Tag). L'activité de conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE par la 12-lipoxygénase recombinante est évaluée sur ces extraits de protéines totales mais également sur les protéines purifiées 12-lipoxygénase issues de ces extraits (dans ce dernier cas, la purification préalable des protéines taguées est effectuée par chromatographie d'affinité à l'aide de colonnes *Pierce® HisPur™* (ThermoFisher) selon les indications du fabricant, voir *paragraphe IX* de ce chapitre).

1. Test d'activité de conversion des protéines recombinantes respectives

* *Sur extrait de protéines totales de cellules COS-7 transfectées (L4+Tag, L4-Tag, LN10+Tag3, LN10-Tag)*

A 100 µl de cellules soniquées (1/10^{ème} de boîte diamètre 90 mm - 170 µg de protéines) sont ajoutés 1 µCi (= 37KBq) / 10 µl éthanol d'acide arachidonique tritié [5,6,8,9,11,12,14,15-³H] (*Perkin Elmer*) et 6 µg / 6µl éthanol d'acide arachidonique non radioactif (acide éicosatétraénoïque 5Z,8Z,11Z,14Z) (*Cayman, Bertin Pharma*). L'analyse est réalisée en triplicate.

* *Sur protéines recombinantes purifiées (L4+Tag, LN10+Tag3)*

A 300µl de protéines purifiées, dont la concentration est évaluée par comparaison au signal détecté par western blot sur des extraits totaux, sont additionnés 1,5 ml de solution tampon Phosphate 0,05 M NaCl 0,3 M Imidazole 0,15 M et 1,5 ml de solution tampon d'activité 2X (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, 4 mM CaCl₂ et 4 mM Glutathion, pH 7.4). Un mélange d'acide arachidonique tritié et d'acide arachidonique sont ajoutés à chaque tube dans les mêmes proportions que pour l'extrait total.

Pour les deux conditions (extraits totaux de cellules COS-7, Protéines 12LOX purifiées), les tubes sont incubés au bain-marie à +38°C pendant 10 minutes (Ho *et al.* 1977). La réaction de conversion est arrêtée au bout de 10 minutes par addition d'acide citrique 1 M (10% du volume d'incubation).

L'extraction de l'acide arachidonique résiduel et du métabolite 12-S-HETE radiomarqué se fait par addition d'un mélange cyclohexane 50% / acétate d'éthyle 50% (5 ml pour 3 ml de mélange réactionnel) et agitation des tubes au vortex. Les tubes sont laissés au repos sur portoir à température ambiante jusqu'à obtention du partage des phases aqueuse et organique. La phase organique supérieure est récupérée et évaporée sous azote jusqu'à obtention d'un résidu humide qui sera solubilisé par 50-100 µl d'éthanol absolu. La totalité du volume reconstitué sera injectée dans la chaîne chromatographique pour séparation et dosage des constituants.

2. Compétition des deux formes 12LOX vis-à-vis de l'activité de conversion de l'acide arachidonique

La même procédure décrite précédemment est adaptée pour le test de compétition entre les deux formes de 12LOX recombinantes.

* *Sur extrait de protéines totales de cellules COS-7 transfectées (L4+Tag, LN10+Tag)*

Chaque extrait de protéines totales de cellules COS-7 transfectées respectivement (L4+Tag, LN10+Tag) ou de cellules COS-7 non transfectées (COS-7 Témoins) est obtenu à partir d'un culot de cellules obtenues par culture sur boîtes de diamètre 90 mm (soit 56,7 cm²).

Dans le mélange réactionnel, la quantité d'extrait de cellules transfectées LN10 est constante (1/10^{ème} de diamètre 90mm). Seule la quantité d'extrait de cellules transfectées L4 est variable de 0, 1 et 5 fois celle d'extrait LN10.

Tableau 10 *Protocole adapté pour le test de compétition des deux formes de protéines 12-lipoxygénase recombinantes purifiées*

Proportion LN10:L4	Volume de fraction LN10 purifiée	Volume de fraction L4 purifiée	Tampon Phosphate 0,05 M / NaCl 0,3 M / Imidazole 0,15 M	Tampon d'Activité enzymatique 2X	Mélange Acide arachidonique/Acide arachidonique tritié
1:0	300	0	1500	1500	40
1:1	300	300	1200	1500	40
1:5	300	1500	0	1500	40
0:1	0	300	1500	1500	40

Tous les volumes indiqués dans le tableau sont en μl . Chaque tube est prévu ici en simple.

La première colonne indique la proportion de chacune des protéines purifiées dans le mélange réactionnel. La quantité de 12-lipoxygénase recombinante purifiée de forme courte (L4) évolue de 0 à 5 fois plus que la quantité de 12-lipoxygénase recombinante purifiée de forme normale (LN10) qui, elle, reste constante dans le mélange.

Seul le dernier tube ne contient que la forme L4, le premier tube ne contenant que la forme normale.

Remarque :

Le mélange Acide arachidonique / Acide arachidonique tritié est préparé préalablement comme suit pour un équivalent à 5 tubes réactionnels

50 μl d'AA ^3H (soit 5 μCi ou 185 KBq) + 90 μl d'AA non radiomarqué à 0,6 $\mu\text{g/ml}$ + 60 μl d'Ethanol absolu
Ce mélange est distribué dans chaque tube réactionnel à raison de 40 μl (soit 1 μCi AA* par tube réactionnel).

Un extrait de cellules non transfectées est ajouté respectivement de 5, 4, 0, afin d'obtenir une concentration constante de protéines totales pour chaque tube réactionnel préparé. Chaque condition est réalisée en triplicate.

* Sur extraits de protéines recombinantes purifiées (L4+Tag, LN10+Tag3)

(Voir protocole de préparation des tubes réactionnels selon le *Tableau 10* ci-contre).

Pour les deux cas de figures (extraits totaux de protéines, extraits purifiés), le protocole d'incubation, d'arrêt de la réaction et d'extraction des métabolites reste le même qu'au paragraphe X- 1 de ce chapitre.

C/ Résultats expérimentaux

La recherche de protéines issues de variants d'épissage de la 12-lipoxygénase ovine a été menée selon la stratégie exposée en fin d'introduction de ce mémoire.

Les travaux préalables à ce projet ont consisté à **identifier les deux transcrits codant pour la 12-lipoxygénase**. Ces études constituent la première partie du projet. Des transcrits ont ainsi pu être isolés par RACE et sous-clonage et le séquençage de ces ARNs messagers nous a permis d'identifier 2 formes distinctes par le dernier exon. L'existence de plusieurs transcrits codant pour la 12-lipoxygénase ovine a été confirmée par RT-PCR, attestant l'existence d'un **phénomène d'épissage alternatif**.

Les questions qui se posent sont les suivantes :

Les deux transcrits sont-ils traduits en protéines ? Si oui, ces dernières sont-elles biologiquement actives ? Quel est le rôle respectif de chacune d'entre elles ?

Nous ne pouvons purifier les protéines putatives correspondantes en l'état à partir d'endomètres ovins, faute de disponibilité de moyens expérimentaux pour ce faire (détection par des anticorps spécifiques, purification en colonne d'affinité...). Ainsi, pour tenter de répondre aux questions que nous nous posons, il nous a fallu faire appel à une procédure de surexpression de ces protéines. La synthèse de telles protéines *in vitro* nous a ainsi permis de disposer des "acteurs" en quantités suffisantes pour les expérimentations qui ont suivi. **L'objectif a donc été de travailler sur des protéines recombinantes produites *in vitro* et purifiées.**

La suite logique a donc consisté ainsi à fabriquer par **synthèse *in vitro* des protéines putatives** codées par ces deux transcrits grâce à la conception de vecteurs d'expression.

*Un premier travail a été effectué en **système procaryote** (*Escherichia coli* souche BL21) à l'aide du vecteur plasmidique pET-16b comprenant une séquence codant pour l'étiquette HIS-Tag. Ce plasmide a permis la synthèse de protéines recombinantes 12-lipoxygénase munies d'une queue poly-Histidine ajoutée en partie N-Terminale dans l'objectif d'une purification. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à obtenir de protéines recombinantes sous leur forme soluble, malgré une production importante par l'hôte bactérien. L'utilisation de divers détergents ou encore de l'urée n'a pas permis de libérer les protéines produites des parois bactériennes auxquelles elles restaient liées. **Cette partie expérimentale ne sera pas développée dans ce mémoire.***

Un changement de modèle de production par l'utilisation d'un **système eucaryote** (cellules de lignée Cos-7) et un vecteur dédié (plasmide pCMV β) s'est donc avéré nécessaire, dans l'objectif d'obtenir les deux protéines solubilisées en milieu aqueux et en quantités suffisantes.

Ce dernier **système de surexpression eucaryote testé (vecteur pCMV β)** a été conçu de façon à disposer de constructions plasmidiques nécessaires à l'obtention de protéines recombinantes avec ou sans tag Histidine, et ce, pour chacune des deux formes recherchées de la protéine 12-LOX (normale LN10, courte L4). Ainsi, 4 constructions plasmidiques ont été mises au point : L4 AVEC Tag, L4 SANS Tag, LN10 AVEC Tag, LN10 SANS Tag.

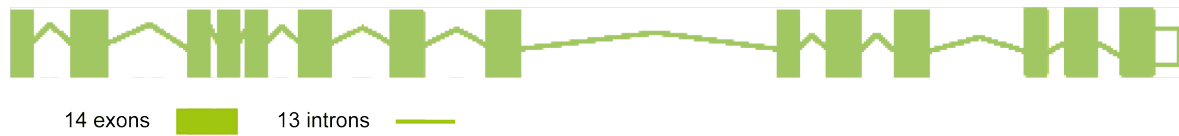
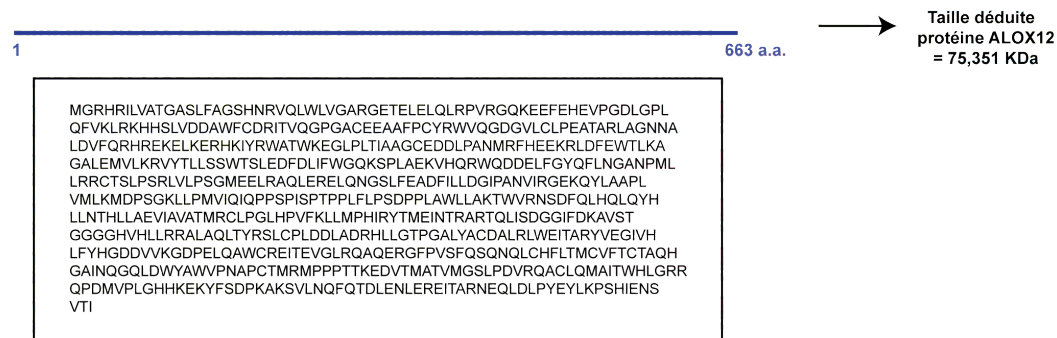
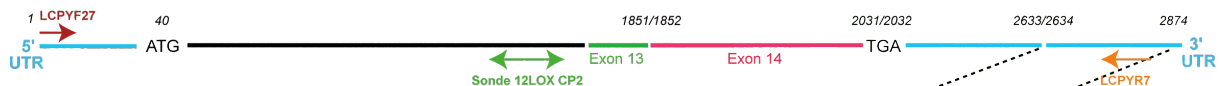
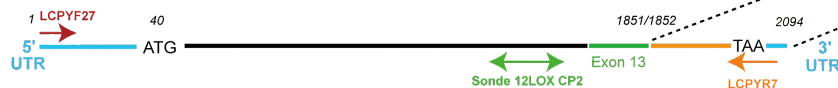
Les protéines taguées Histidine peuvent être reconnues par l'anticorps anti-His Tag du commerce dont nous disposons. Afin de mettre en évidence les protéines recombinantes produites dénuées de Tag Histidine, il nous a fallu disposer d'anticorps spécifiques pour chacune des deux formes synthétisées *in vitro*. Mais comment détecter les protéines recombinantes non taguées? Nous avons donc procédé à une immunisation de lapins au laboratoire à l'aide d'injections de peptides spécifiques de chacune des formes de 12-lipoxygénase recherchées (peptide L4 pour la forme courte, peptide LN10 pour la forme normale). La conception de ces peptides a été rendue possible grâce à la traduction *in silico*

des transcrits correspondants et qui ont fait l'objet de la première partie du travail. Nous présenterons donc les résultats expérimentaux, liés à la **caractérisation des immunsérums anti-peptides L4 et LN10**, obtenus sur cellules COS-7 transfectées, nous garantissant leur validation pour les suites expérimentales à donner. Le protocole expérimental lié à l'immunisation de lapins, *stricto sensu*, est quant à lui développé dans le chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*" de ce mémoire.

C'est dans ces dernières expérimentations de surexpression en cellules eucaryotes et la caractérisation des immunsérums sur cellules COS-7 transfectées que réside la **deuxième partie de ce projet**. La **recherche par Western blot de la 12-lipoxygénase dans les cellules luminales d'endomètre utérin** de brebis au cours du cycle œstral et en début de gestation a également été menée à l'aide des anti-peptides avec un protocole mis au point lors de leur caractérisation. Les périodes explorées sont identiques à celles de la cinétique des transcrits détectés par Northern blot dans les expérimentations préliminaires. Les deux cinétiques (transcrits et protéines) suivent-elles la même évolution?

Les constructions munies d'un Tag Histidine ont été réalisées de façon à envisager la purification des protéines produites *in vitro* sur des colonnes d'affinité dédiées (Matrice Cobalt). Pour ce faire, il nous a été nécessaire de **trouver les bonnes conditions expérimentales pour obtenir des protéines synthétisées en fraction soluble**. Ce fut là la **troisième partie du projet**. Les diverses fractions de purification obtenues ont été analysées avec les immunsérums anti-peptides de lapin et l'anticorps anti-His Tag du commerce.

La quatrième partie du projet a consisté à évaluer l'**activité biologique des protéines recombinantes** produites par mesure de l'activité de conversion de l'acide arachidonique radiomarqué en un métabolite : le 12-HETE. Cette évaluation a été effectuée par une technique de chromatographie (HPLC) **sur des extraits de protéines totales mais également sur des protéines purifiées** du modèle cellulaire eucaryote utilisé (COS-7). Un test de compétition des 2 formes de protéine 12-lipoxygénase a également été mené. La conception et la fabrication des constructions sans Tag Histidine, quant à elles, trouvent pleinement leur justification ici : la présence d'un Tag pourrait entraîner un encombrement stérique occasionnant alors la baisse voire l'annulation de toute activité enzymatique.

A**Gène *ALOX12* (*Ovis aries*) (Ensembl ENSOARG0000009252)****B****Transcrit *ALOX12* (*Ovis aries*) (Ensembl ENSOART00000010081)****C****Protéine déduite *ALOX12* (*ovis aries*) (Genbank XP_014954081, Uniprot W5PHM1)****D****Caractérisation des 2 transcrits *ALOX12* identifiés par RACE****Forme longue 12LOX LN10 (2877 pb, CDS = 1992 bp)****Forme courte 12LOX L4 (2094 bp, CDS = 1899 bp)****Figure 32a Représentation du gène (A), du transcrit (B) et de la protéine (C) de la 12-lipoxygénase ovine référencés dans les banques de séquences**

La Figure D est une illustration des deux séquences de transcrits spécifiques de la 12-lipoxygénase ovine, identifiées par la stratégie de RACE. Les amorces oligonucléotidiques Sens LCPYF20 et Antisens LCPYR7 permettent de couvrir l'ensemble des séquences. La sonde 12LOX CP2 (Exon 12-début Exon 13) de 277 Pb utilisée en Northern blot a été positionnée sur les séquences des deux transcrits. Les parties non transcrites 5' et 3' UTRs ont été identifiées grâce aux amorces du kit "FirstChoice™ RLM-RACE" (Ambion) et à des amorces spécifiques dessinées sur la partie codante des séquences bovines disponibles dans les banques.

I- Isolement et caractérisation des 2 transcrits de la 12-lipoxygénase ovine

1. RACE / Clonage des ADNc en vecteur *pGEM®-T Easy* / Séquençage des clones obtenus (voir Figures 32a, 32b et 32c)

Des ADNc ont été obtenus par transcription inverse d'ARNs totaux de cellules luminales d'endomètre ovin à 12 jours de gestation. La procédure de *RACE*, qui repose sur une technique de PCR (utilisation du kit *FirstChoice™ RLM-RACE (Ambion)*), a permis la détection des deux transcrits observés par Northern blot dans l'utérus ovin (Formes longue LN10 et courte L4). Des amplicons ont été obtenus par utilisation d'une amorce Sens (5' *Outer*) et d'un groupe d'amorces Antisens dessinées, réparties sur l'ensemble de la séquence codante bovine disponible (*Genbank Y08829*). Chaque amplicon obtenu a été sous-cloné en vecteur *pGEM®-T Easy* et séquençé. Les informations de séquences ainsi obtenues ont été alignées par utilisation de la suite logicielle *EMBOSS* disponible sur le portail web "*Mobyle Pasteur*".

Afin de reconstituer la séquence entière (ou contig) de chacun des deux transcrits de la 12-lipoxygénase, l'ensemble des séquences a été soumis à la fonction *Merger* de la même suite logicielle (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::merger>).

L'utilisation des amorces spécifiques des adaptateurs 5' et 3' (5' *Outer* et 3' *Outer*), associées à des amorces Antisens définies dans la séquence codante nous a permis **d'identifier les parties non traduites (5' et 3') de chacun des deux ARNs**. Nous disposons donc de deux transcrits polyadénylés :

- 1 équivalent à la référence des banques (forme longue ou "normale" de 2877 pb et correspondant au transcrit observé par Northern blot d'une taille évaluée à 3,2 Kb),
- 1 modifié par épissage de l'exon 14 (forme courte de 2094 pb correspondant au transcrit évalué à 2,6 Kb par Northern blot). Il y a ainsi disparition de 93 bases de la séquence codante au sein de cette forme courte, ce qui correspond à 31 acides aminés.

Ces ADNc ont été insérés en vecteur *pGEM®-T Easy*.

L'alignement des séquences nucléotidiques entières entre les transcrits de formes courte L4 et normale LN10 de la 12-lipoxygénase, identifiées montre que **les 1851 premiers nucléotides sont communs (depuis le 5' UTR jusqu'à l'exon 13). Le transcrit normal de la 12-lipoxygénase comporte 14 exons, le transcrit court en comporte 13 additionné de la fin du 3' UTR et disparition complète de l'exon 14. La séquence de ce transcrit court rend ce dernier éligible pour une traduction en protéine**. Le 3' UTR de la forme 12LOX L4 est ainsi plus court que celui de la forme LN10, les 5' UTR des deux formes étant identiques. Les deux codons STOP sont différents (TGA pour la forme longue, TAA pour la forme courte).

Les séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques obtenues (voir Figures R1b et R1c) (sur la base de 1 Kb équivaut à 333 a.a. soit 37 KDa) montrent que :

- La forme longue LN10 de la protéine putative comporte 663 acides aminés, ce qui correspond à une taille déduite de 73,704 KDa,
- La forme courte L4 de la protéine putative n'en comporte que 632 soit une taille déduite de 70,263 KDa.

Nous avons pu ainsi identifier la séquence entière de chacun des deux transcrits de la 12-lipoxygénase de l'endomètre ovin. Un couple d'amorces oligonucléotidiques (amorce Sens LCPYF27 en 5' UTR *ACGGACCCGGCTCCCCTC*, amorce Antisens LCPYR7 en 3' UTR *CATTGATTTACACGTTGCC*) a permis d'amplifier l'ensemble de chaque transcrit, permettant d'obtenir leurs séquences entières et de s'assurer de l'exactitude de celles-ci en regard des diverses portions obtenue.

ATGGGCCGCTACCGCATCCTCGTGGCCACCGGGCCCTCGCTCTTCGCCGGCTCGCACAAAC 60
M G R Y R I L V A T G A S L F A G S H N
CGCGTGCAGCTGTGGCTGGTCCGGGGCGCGGGGAAACGGAGCTGGAGCTGCAGCTGCGG 120
R V Q L W L V G A R G E T E L E L Q L R
CCAGTCCGGGGCCAGAAGGAGGAGTTTGGACACGAAGTTCCGGGGACCTGGGGCCGTTG 180
P V R G Q K E E F E H E V P G D L G P L
CAGTTCGTGAAGTTGCGCAAACACCACTCCCTGGTGGACGACCGGTGGTTCTGCGACCGC 240
Q F V K L R K H H S L V D D A W F C D R
ATCAGGTTGCAGGGCCCTGGAGCCTGCGAGGAGGCCGCGTTCCTCGTATCGCTGGGTG 300
I T V Q G P G A C E E A A F P C Y R W V
CAGGGTGCAGGCGTGTGTGCTGCCAGAGGCCACCGCCCGCTGGCAGGAAACAATGCA 360
Q G D G V L C L P E A T A R L A G N N A
TTGGATGTGTCCAGAGACATCGAGAGAAGGAGCTGAAAGAAAGACATAAGATATACCGC 420
L D V F Q R H R E K E L K E R H K I Y R
TGGGCCACCTGGAAGGAAGGTTACCCCTGACAATAGCTGCGAGCTGTGAGGACGATCTA 480
W A T W K E G L P L T I A A G C E D D L
CTGCAAAATATGAGATTCCACGAGGAGAAGAGGCTGGACTTTGAGTGGACACTGAAGGCA 540
P A N M R F H E E K R L D F E W T L K A
GGGCTCTGGAGATGGTCCCAACGTGTTACACCTTCCTGAGCTCCTGGACCATGTG 600
G A L E M V L K R V Y T L L S S W T S L
GAGGATTTTGTATCTCATCTTCTGGGGCCAGAAGGCCCTTGGCTGAGAAGGTTACACG 660
E D F D L I F W G Q K S P L A E K V H Q
CGTGGCAGGACGATGAGTTGTTGGCTACCAGTTCTCAATGGCGCAACCCCATGCTG 720
R W Q D D E L F G Y Q F L N G A N P M L
TTGAGACGCTGCACCTCTGCGCTTCTCGGCTGGTGTGCGCTCGGGGATGGAGGAGCTA 780
L R R C T S L P S R L V L P S G M E E L
CGGGCCAGCTGGAGAGAGAATCCAGAACGGTTCCTGTTGAGGCTGATTCATCCTC 840
R A Q L E R E L Q N G S L F E A D F I L
CTGGATGGAATTCAGCCAACGTGATCCGAGGAGAGAAGCAGTACCTGGCTGCCCCCTC 900
L D G I P A N V I R G E K Q Y L A A P L
GTCATGCTCAAGATGGACCCAGTGGAAAGCTGCTACCCATGGTTCATCCAGATCCAGCCT 960
V M L K M D P S G K L L P M V I Q I Q P
CCAGCCCATCTCCCAACCCCACTGTTCTGCGCTCGGATCCTCCACTCGCCTGG 1020
P S P I S P T P P L F L P S D P P L A W
CTCCTGGCAAGACCTGGGTCCGAAATTCAGATTCCAACTGCATCAGCTCCAATACCAT 1080
L L A K T W V R N S D F Q L H Q L Q Y H
TTGCTAACACCCATCTGCTGGCTGAGGTCATTGCCGTGGCCACCATGAGTGCCTCCCA 1140
L L N T H L L A E V I A V A T M R C L P
GGGCTGCACCCCTGTCTCAAGCTCCTGATGCCACACATCCGCTACACGATGGAAATCAAC 1200
G L H P V F K L L M P H I R Y T M E I N
ACCAGGACGAGCTCAGCTCATCTCAGATGGAGGCATATTTGATAAAGCTGTGAGCACC 1260
T R A R T Q L I S D G G I F D K A V S T
GGTGGAGGGGGTATGTCACCTTGTCCGCGGGCCCTGGCTCAGCTGACCTACCGCTCC 1320
G G G H V H L L R R A L A Q L T Y R S
CTCTGTCTTGGACGATCTGGCTGATCGACACCTGCTGGGAACCCAGGTGCTCTCTAC 1380
L C P L D D L A D R H L L G T P G A L Y
GCCTGGCATGCTTACGGCTCTGGGAAATCACTGCCCGTATGTGGAGGGGATTGTCCAC 1440
A C D A L R L W E I T A R Y V E G I V H
CTCTTCTACACGGGGATGACGTTGTAAGGGGACCCCTGAGCTGCAAGCCTGGTGTCCG 1500
L F Y H G D D V V K G D P E L Q A W C R
GAGATCACTGAGTGGGCTGCGCCAGGCCAGGAGGTTTCCCTGTCTCCTTCCAG 1560
E I T E V G L R Q A Q E R G F P V S F Q
TCCAGAAATCAACTCTGCATTTCCATTACCATGTGTGTTTTCAGTGCACCTGCTCAGCAT 1620
S Q N Q L C H F L T M C V F T C T A Q H
GGGGCCATCAACAGGGCCAGCTGGACTGGTATGCTGGTCCCTAATGCCCATGCACA 1680
G A I N Q G Q L D W Y A W V P N A P C T
ATCGGATGCCCCACCACCACCAAGGAGATGTGCAATGGCCACCGTGTGGGCTCA 1740
M R M P P P T T K E D V T M A T V M G S
CTACCTGATGTCGACAAAGCCTGTCTTCAAATGGCCATCACGTGGCATCTGGGTGCGCCG 1800
L P D V R Q A C L Q M A I T W H L G R R
CAGCCAGACATGGGATCTTCTCAATACAGAGATCAAACTGCATCTCCTGCAGTGGCAG 1860
Q P D M G I F S I Q R S N L H L L H W Q
TTGGATCTTTACCATTGCACCACCTGGGAAGCCCT**TAA** 1899
L D S L P L H H L G S P **STOP**

GGAAAGGGTCTGATAATATGTTAGGTTTTGGAAGCCACACTGACTCTTGTACAGCTATTC 1959
AATCTCTTGTGTAGCACAAAAGCAGCCACAGGCAACGTGTAATCAATGTGGCTATGTT 2019 **3' UTR**
CCAATAAAACTTTATTTATGGACAGTGAATATG 2053

Figure 32b Alignement de la séquence nucléotidique du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine forme courte L4 avec sa séquence peptidique déduite. Utilisation de la suite logicielle Expasy (http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa).

La séquence nucléotidique (2092pb, CDS de 1899 Pb) a été identifiée après RACE puis clonage et séquençage du transcrit entier. Les bases nucléotidiques sont numérotées selon l'orientation 5' vers 3', depuis la première base correspondant au codon ATG de la Méthionine d'initiation. La séquence d'acides aminés est affichée sous la séquence nucléotidique, selon le code "1 lettre", débutant à la première méthionine. Les parties non traduites (5' et 3' UTRs) sont indiquées en caractères gras (vert en 5', noir en 3'), le codon START (rouge) et le codon STOP (bleu) le sont sur la séquence protéique déduite (632 a.a.).

ATGGGCCGCTACCGCATCTCGTGGCCACCGGGCCCTCGCTCTTCGCCGGCTCGCACAAAC 60
M G R Y R I L V A T G A S L F A G S H N
CGCGTGCAGCTGTGGCTGGTCCGGGCGCGGGGAAACGGAGCTGGAGCTGCAGCTGCCG 120
R V Q L W L V G A R G E T E L E L Q L R
CCAGTGGGGGCCAGAAGGAGGAGTTTGGAGCAGAAAGTTCCGGGGACCTGGGGCCGTTG 180
P V R G Q K E E F E H E V P G D L G P L
CAGTTCTGTGAAGTTGCGCAAACACCACCTCCCTGGTGGACGACGCGTGGTTCTGCGACCGC 240
Q F V K L R K H H S L V D D A W F C D R
ATCACGGTGCAGGGCCCTGGAGCCTGCGAGGAGGCGCGTTCCCGTGTATCGCTGGGTG 300
I T V Q G P G A C E E A A F P C Y R W V
CAGGGTGCAGCGTGTGTGCTGCGCAGAGGCCACCGCCCGCTGGCAGGAAACAATGCA 360
Q G D G V L C L P E A T A R L A G N N A
TTGGATGTGTTCCAGAGACATCGAGAGAAGGAGCTGAAAGAAAGACATAAGATATACCGC 420
L D V F Q R H R E K E L K E R H K I Y R
TGGGCCACCTGGAAGGAGGTTACCCCTGACAATAGCTGCAGGCTGTGAGGACGATCTA 480
W A T W K E G L P L T I A A G C E D D L
CCTGCAATATGAGATTCACGAGGAGAAGAGGCTGGACTTTGAGTGGACACTGAAGGCA 540
P A N M R F H E E K R L D F E W T L K A
GGGGCTCTGGAGATGGTCTCAAACGTGTTTACACCTCCTGAGCTCCTGGACCAGTCTG 600
G A L E M V L K R V Y T L L S S W T S L
GAGATTTGTATCTCATCTTCTGGGGCCAGAAGACCCCTGGCTGAGAAGGTTACCCAG 660
E D F D L I F W G Q K S P L A E K V H Q
CGCTGGCAGGACGATGAGTTGTTGGCTACCAAGTTTCTCAATGGCCCAACCCCATGCTG 720
R W Q D D E L F G Y Q F L N G A N P M L
TTGAGACGCTGCACCTCTGCTGCTTCTGGTGGTGTGCTGCCCTCGGGATGGAGGAGCTA 780
L R R C T S L P S R L V L P S G M E E L
CGGCCACGCTGGAGAGAGAACTCCAGAAGGTTCCCTGTTGAGGCTGATTCATCCTC 840
R A Q L E R E L Q N G S L F E A D F I L
CTGGATGGAATCCAGCAACGTGATCCGAGGAGAGAAGCAGTACCTGGTGCCTCCCTC 900
L D G I P A N V I R G E K Q Y L A A P L
GTCATGCTCAAGATGGACCCAGTGGAAAGCTGCTACCCATGGTCATCCAGATCCAGCCT 960
V M L K M D P S G K L L P M V I Q I Q P
CCCAGCCCATCTCCCAACCCACCCTGTTCTGCTCGGATCCTCCACTCGCTGG 1020
P S P I S P T P P L F L P S D P P L A W
CTCCTGGCAAAGCTGGTCCGAAATTCAGATTTCCAACCTGCATCAGCTCCAATACCAT 1080
L L A K T W V R N S D F Q L H Q L Q Y H
TTGCTCAACCCATCTGCTGGCTGAGGTGATGCGGTGGCCACCATGAGGTGCCTCCCA 1140
L L N T H L L A E V I A V A T M R C L P
GGGTGCACCTGTCTTCAAGCTCCTGATGCCACACATCCGCTACACGATGGAAATCAAC 1200
G L H P V F K L L M P H I R Y T M E I N
ACAGGGCACGGACTCAGCTCATCTCAGATGGAGGATATTTGATAAAGCTGTGAGCAC 1260
T R A R T Q L I S D G G I F D K A V S T
GGTGGAGGGGTGCTGCTGCTCCGCGGGCCCTGGCTCAGCTGACCTACCGCTCC 1320
G G G H V H L L R R A L A Q L T Y R S
CTCTGCTCTTACGACTGCTGGCTGATCGACACCTGCTGGGAACCCAGGTGCTCTCTAC 1380
L C P L D D L A D R H L L G T P G A L Y
GCCTGCGATGCTTACGGCTCTGGGAAATCACTGCCCGGTATGTGGAGGGGATGTCCAC 1440
A C D A L R L W E I T A R Y V E G I V H
CTCTTACCACGGGATGACGTTGTAAAAGGGGACCTGAGCTGCAAGCCTGGTGTCCG 1500
L F Y H G D D V V K G D P E L Q A W C R
GAGATCACTGAGGTGGGGTGCGCCAGGCCAGGAGGAGGTTTCCCTGTCTCCTTCCAG 1560
E I T E V G L R Q A Q E R G F P V S F Q
TCCAGAATCAACTCTGCCATTTCCCTTACCATGTGTGTTTTCACGTGCACTGCTCAGCAT 1620
S Q N Q L C H F L T M C V F T C T A Q H
GGGGCCATCAACCCAGGCCAGCTGGACTGGTATGCTGGTCCCTAATGCCCCATGCACA 1680
G A I N Q G Q L D W Y A W V P N A P C T
ATGCGGATGCCCCACCACCACCAAGGAAGATGTGACAATGGCCACCGTGTGGGGTCA 1740
M R M P P P T T K E D V T M A T V M G S
CTACTGATGTCGACAAGCCTGTCTTCAAATGGCCATCAGTGGCATCTGGGTGCGCCG 1800
L P D V R Q A C L Q M A I T W H L G R R
CAGCCAGACATGGTCCCTGCGGCATCACAAGAAAAGTATTTCTCAGACCCCAAGGCC 1860
Q P D M V P L G H H K E K Y F S D P K A
AAGTCTGACTAAATCAATTCAAACAGATCTGGAAGAACTGGAAAGGAAATTCAGCC 1920
K S V L N Q F Q T D L E N L E R E I T A
CGCAATGAGCAACTGACCTGCCCTATGAATACCTAAAGCCAGCCACATAGAGAACAGC 1980
R N E Q L D L P Y E Y L K P S H I E N S
GTCATATT**GTG** 1992
V T I **STOP** **GCTCTAGGG** 2001
CGCCCCCATGGGCGAGCTGCAGATCAGCTCTGGGACTGACAATCCATCTTGAGTTTC 2061
AGTTCAGTTCAGTTTGTTCACCCCTCAGTCTGCTCCGACTCTGCAACCCATGAAGCTGC 2121
CGCAGCCAGGCTCCCTGTCCATCCCAACTCCCGGAGTTCACCTCAAACCTACGTCCT 2181
CGAGTCCGTGATGCCATCCAGCCATCTCATCTCTGTCTATCCCTTCTCCTGCCCCCAAT 2241
CCCTCCAGCATCAGAGTCTTTTCCAATGAGTCAACTCTGTGTTGCTGTTCACTTGCTAA 2301
GTCCGCGCTGACACTTTGCAACCCCTGGACTGTAGCACACCAGGCTCCTCTGTCTCTCA 2361
TTATCTCCAGAGTATGCTCAAATTCATCTGCTGCTGAGGTTATTTCTTTCCCAATTA 2421
AACCACCTACATCTGTATCCTATGAGCCCAAGGGCCCTTTCAGGTTGTCATGCTGAGTTA 2481
CTCAGTCTGACTGACCACTTATGCGACCCCATGGACTGTAGCCACCAGGCTCCTCTGT 2541
CCATGGGATTATCCAGGCAAGAATACTGAAGTGGTCCGCAATTTCTATCCAGGGGATC 2601
TTCTCAATACAGAGATCAAACTGCATCTCTGCACTGGCAGTTGGATTCTTTACCATTC 2661
CACCACCTGGGAAGCCCTAAGGAAAGGGTCTGATAAATATGTTAGGTTTGGAAAGCCACA 2721
CTGACTCTGTGACAGCTATTCATCTCTGTTGTAGCACAAAAGCAGCCACAGGCAAC 2781
GTGTAATCAATGTGGCTATGTTCCAATAAACTTTATTTATGGACAGTGAATATG 2838

3' UTR

Figure 32c Alignement de la séquence nucléotidique du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine forme normale LN10 avec sa séquence peptidique traduite. Utilisation de la suite logicielle Expasy (http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa).

La séquence nucléotidique (2877 Pb, CDS de 1992 Pb) a été identifiée après RACE puis clonage et séquençage du transcrit entier. La codification adoptée est la même que celle de la Figure 1b. Les parties non traduites (5' et 3' UTRs) sont indiquées en caractères gras (vert, noir), le codon START (rouge) et le codon STOP (bleu) le sont sur la séquence protéique déduite (663 a.a.).

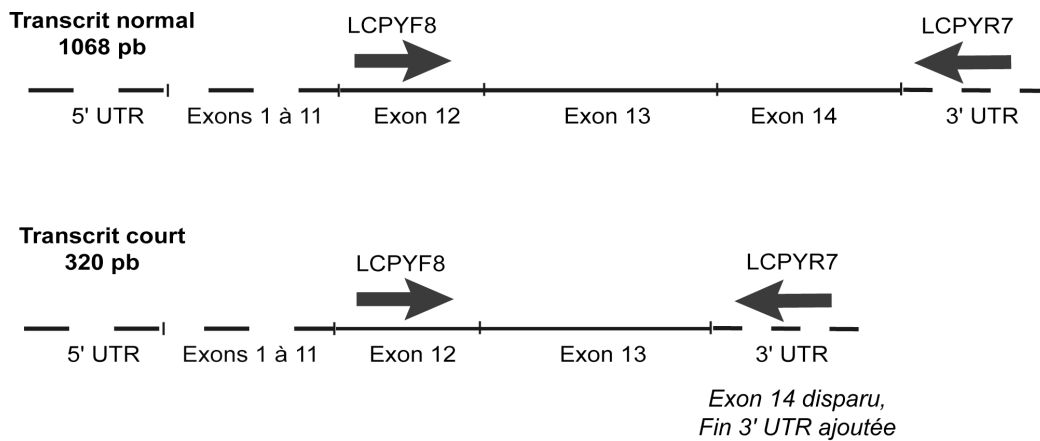
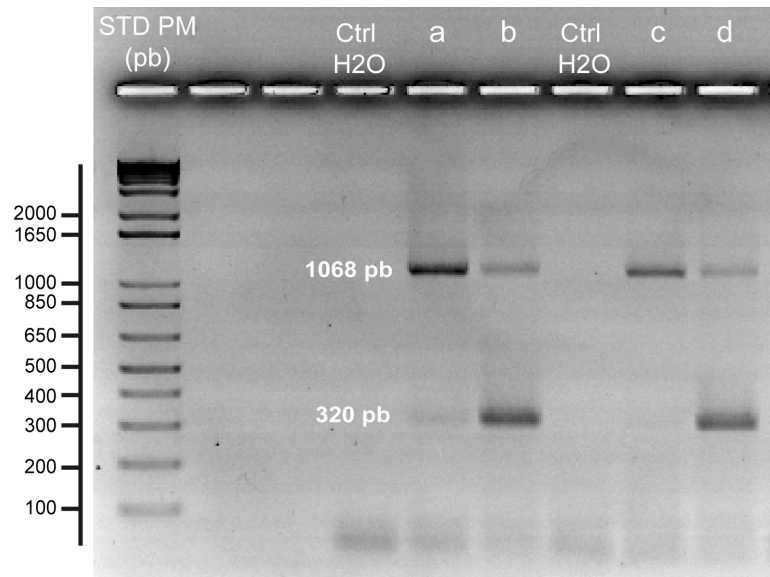


Figure 33 Détection par RT-PCR (35 cycles) des deux transcrits de la 12-lipoxygénase exprimés par l'épithélium luminal d'endomètre de brebis

4 brebis en début de gestation ont été utilisées : 2 brebis à 9 jours (a et c), 2 brebis à 14 jours (b et d).

2 amplicons (320 et 1068 Pb) sont obtenus par un même couple d'amorces oligonucléotidiques (LCPYF8 et LCPYR7). La partie basse de l'illustration montre le positionnement des amorces sur chacune des formes de transcrits.

Le transcrit correspondant à la forme normale (1068 Pb) est détecté aux 2 stades de gestation testés alors que la forme courte (320 Pb) est surtout présente au 14^{ème} jour, stade de début d'implantation de l'embryon dans l'endomètre utérin.

2. Mise en évidence de variants d'épissage par PCR semi-quantitative

Les expérimentations de RACE précédentes ont permis de démontrer l'existence de deux transcrits qui diffèrent l'un de l'autre par la disparition du dernier exon (exon 14) et du début de la zone 3' UTR pour le transcrit de la forme courte de la 12-lipoxygénase (Transcrit que nous nommons "L4").

L'identification complète de la séquence de chacun des deux transcrits isolés (RACE et sous-clonage) nous a permis de définir des amorces oligonucléotidiques LCPYF8 (amorce Sens située sur l'exon 12) et LCPYR7 (amorce Antisens située sur la partie 3'UTR) (voir *Tableau 6* Chapitre "*Matériels et Méthodes*"). **Ce couple d'amorces oligonucléotidiques peut nous permettre de caractériser la présence des 2 formes de transcrits plus aisément et plus rapidement que par la technique de Northern blot.**

Ces amorces ont été utilisées en RT-PCR sur des extraits d'ARNs totaux provenant d'endomètres de 4 animaux gravides : 2 brebis au 9^{ème} jour, 2 brebis au 14^{ème} jour de gestation (voir *Figure 33*).

2 amplicons (320 et 1068 pb) sont obtenus avec le couple d'amorces au 14^{ème} jour de gestation alors que **le 9^{ème} jour montre principalement la présence du transcrit de forme normale (1068 pb) (voir *Figure 31*). La forme courte est surtout présente au 14^{ème} jour**, stade de début d'implantation de l'embryon dans l'endomètre utérin.

Nous confirmons donc les observations faites lors des expérimentations préliminaires par Northern blot (voir résultats Chapitre "*A/ Introduction*", *Figures 19 a & b*).

II- Production *in vitro* de protéines recombinantes par un modèle eucaryote : transfection transitoire en cellules COS-7

A- Conception de Vecteurs d'expression pCMV avec/sans Tag Histidine

1. Généralités

Une première production de protéines recombinantes en système procaryote (*E. coli* souche *BL21*). Le vecteur d'expression choisi a été le *pET-16b* (*Novagen*) permettant l'obtention de protéines avec queue poly-histidine en partie N-Terminale, dans l'objectif de pouvoir les purifier *a posteriori*. Les amplicons à insérer, correspondant aux deux transcrits identifiés (Forme longue 12LOX LN10 et forme courte 12LOX L4), ont été obtenus par PCR à partir des vecteurs de clonage *pGEM®-T Easy*. Nous sommes parvenus à obtenir des clones bactériens produisant une grande quantité de protéines détectables par Western blot avec un anticorps dirigé contre le tag HISTIDINE. Malheureusement, ces protéines ne se présentaient pas sous forme soluble (critère nécessaire pour permettre leur purification), malgré l'utilisation de divers détergents. Les protéines sont restées liées aux parois des bactéries. Un changement de système de production s'impose, et un vecteur d'expression eucaryote semble être une alternative. Le vecteur *pCMVβ* (*BD Biosciences, Clontech*) est choisi.

1.1. Constructions plasmidiques souhaitées

Dans l'objectif de produire des protéines recombinantes en cellules eucaryotes, le vecteur *pCMVβ* est choisi et conçu en plusieurs versions (voir *Figure 34a et 34b*) :

- *pCMVβ* avec insert L4, avec/sans séquence His Tag,
- *pCMVβ* avec insert LN10, avec/sans séquence His Tag.

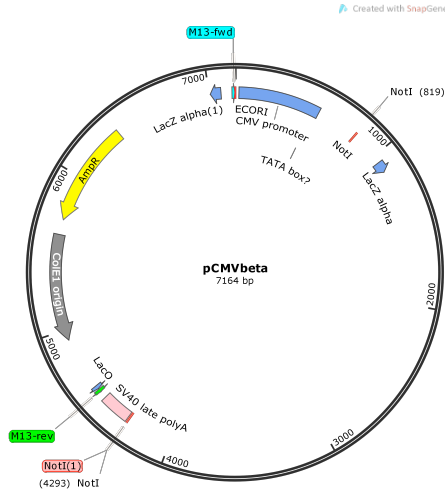
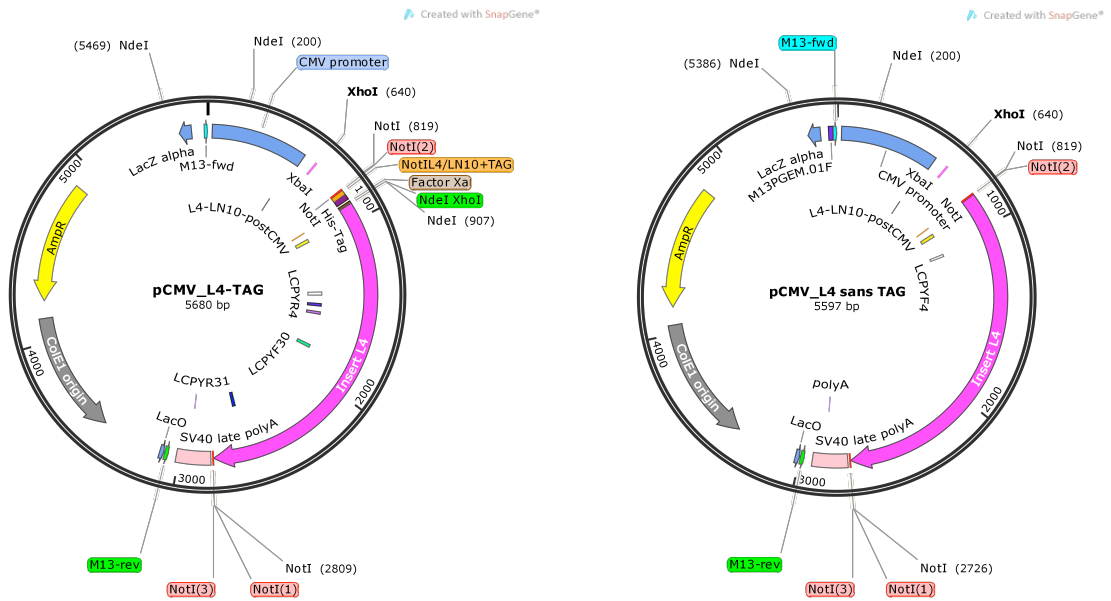
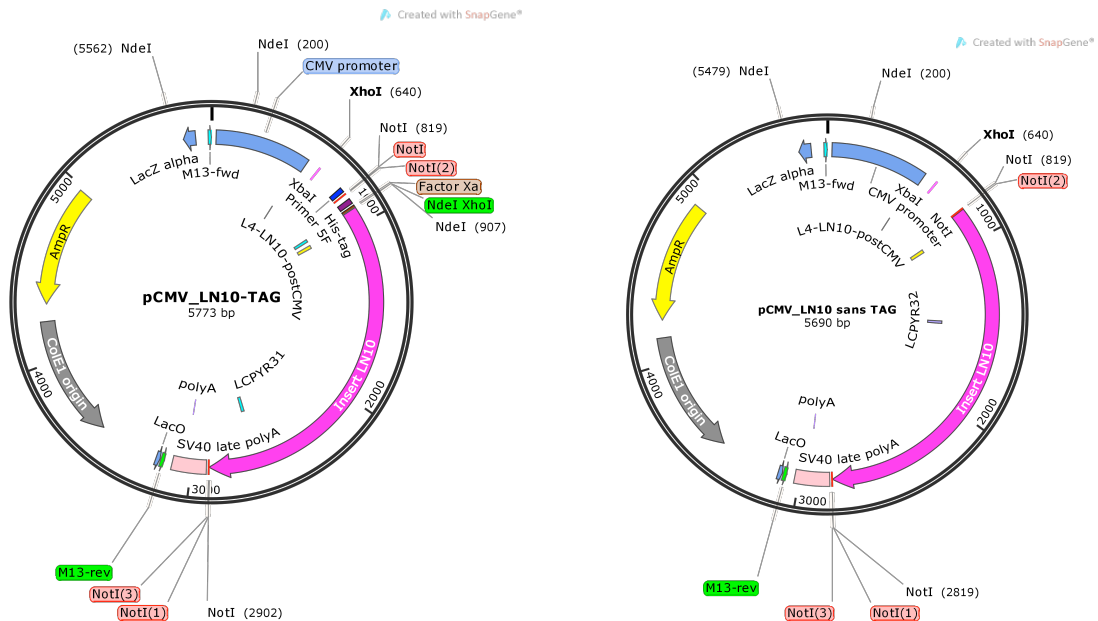
A**B****C**

Figure 34a Cartes des vecteurs d'expression eucaryote conçus à partir du plasmide pCMVβ (BD Biosciences, Clontech) (Schémas conçus via le logiciel SnapGene®)

Cartes plasmidiques des vecteurs eucaryotes à obtenir (*suite légende Figure 32a*)

La carte de la *Figure 32a Partie A* représente le vecteur d'origine pCMV β .

Figure 32a Partie B : Vecteur pour expression de la protéine correspondant à la forme courte du transcrit 12-lipoxygénase (L4) dans sa version avec Tag Histidine (à gauche) et non taguée (à droite).

Figure 32a Partie C : Vecteur pour expression de la protéine correspondant à la forme longue du transcrit 12-lipoxygénase (LN10) dans sa version avec Tag Histidine (à gauche) et non taguée (à droite).

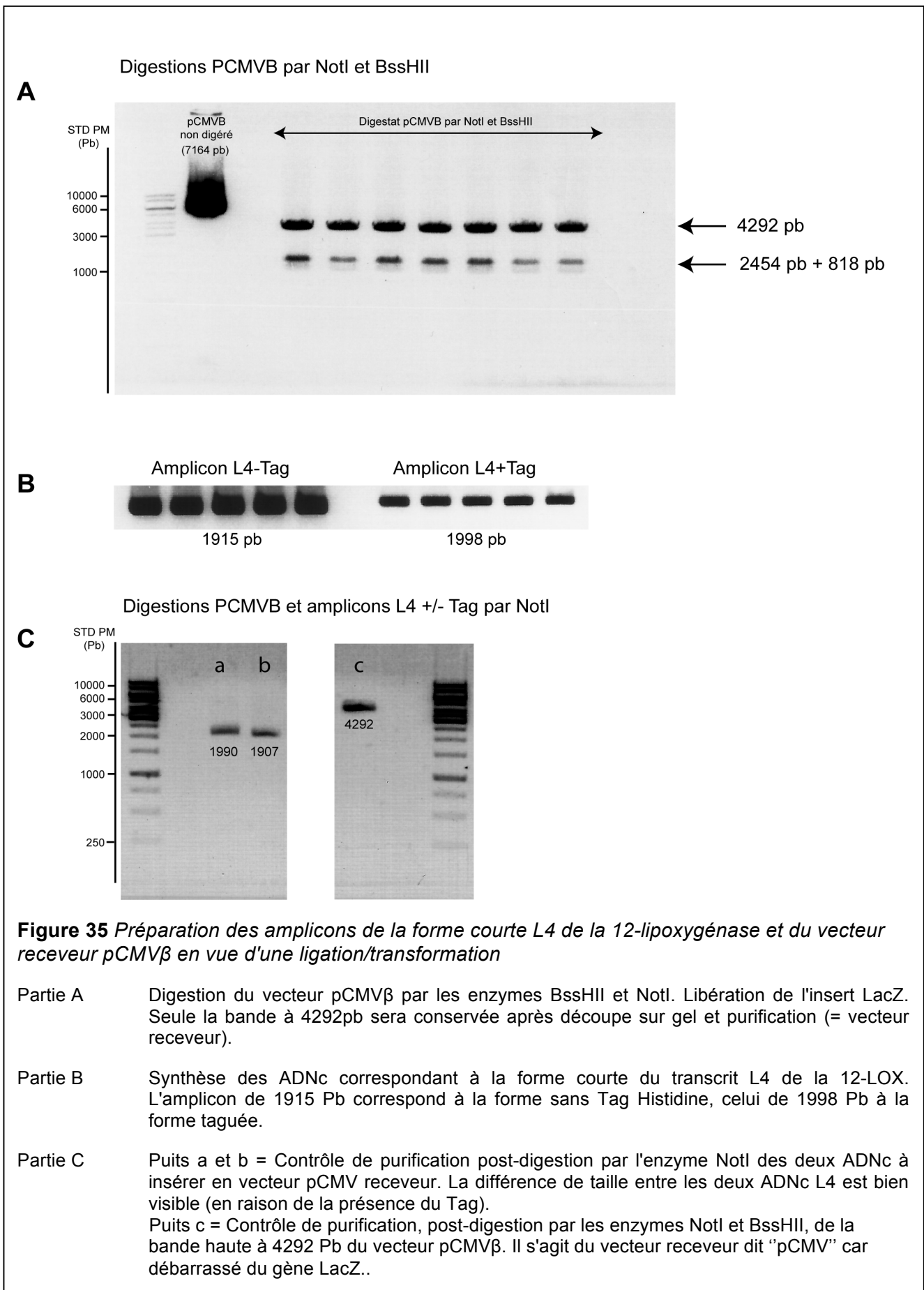
Les deux transcrits (sous forme d'ADNc) ont été insérés dans le site de multiclonaage grâce aux sites de restriction NotI. Seules les séquences codantes ont été introduites respectivement (sans les parties 5' et 3' UTR).

Ces quatre constructions comportent un promoteur CMV pour une expression en cellules eucaryotes COS-7, une séquence de résistance à l'ampicilline (codant pour une Beta lactamase) utile au clonage en bactéries pour la production de chaque vecteur. Les versions annotées "Tag" comportent une séquence poly-Histidine en partie N-Terminale de la protéine recombinante à produire et une séquence de reconnaissance du site de coupeure du Facteur Xa (protéase permettant d'éliminer le tag Poly-Histidine ultérieurement en cas de besoin).



Figure 34b Schéma simplifié du vecteur eucaryote pCMV 12-lipoxygénase pour chacun des ADNc insérés (Forme courte L4, Forme normale LN10)

Chaque ADNc est inséré dans le site de multi-clonage entre les deux sites NotI. L'expression se fait sous contrôle du promoteur CMV. Une séquence codant pour le Tag Histidine suivie de la séquence du site de coupeure du Facteur Xa est située en amont de l'insert pour chaque version (L4, LN10) (schéma du haut).



La séquence His Tag permettra d'obtenir des protéines munies d'une queue poly Histidine clivable en partie N-Terminale afin de permettre leur purification sur colonne de chromatographie d'affinité. Une séquence de fixation du Facteur Xa est prévue sur ce vecteur afin de pouvoir se débarrasser du Tag après la purification des protéines produites. Les versions sans His Tag sont prévues dans le cas où le Tag His entraverait l'activité biologique putative des enzymes produites *in vitro*.

1.2. Choix des matrices pour les amplifications

Les matrices de départ sont les plasmides respectifs **pET-16b LN10 clone 22 et pET-16b L4 clone 10** mis au point lors des tests préalables pour une surexpression de la 12-lipoxygénase en cellules procaryotes. Ces matrices dotées de la séquence His Tag permettront l'obtention de protéines **avec une extrémité N-Terminale Poly-Histidine**.

Les matrices **pGEM®-T Easy respectives LN10 clone 03 et L4 clone 02** seront utilisées pour l'obtention de protéines recombinantes respectives **sans queue Poly-Histidine**.

1.3. Conception des amorces pour la synthèse des ADNc de chacun des transcrits de la 12-lipoxygénase ovine

Les amorces oligonucléotidiques (voir *Tableau 6* du chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*"), utilisées pour l'amplification des inserts des matrices choisies sont conçues de façon à prévoir 4 types de constructions plasmidiques en vecteur pCMV β : 1 vecteur avec insert LN10 AVEC Tag HIS, 1 vecteur avec insert LN10 SANS Tag HIS, 1 vecteur avec insert L4 AVEC Tag HIS, 1 vecteur avec insert L4 SANS Tag HIS.

1.4. Préparation du vecteur receveur pCMV β

Pour l'ensemble des 4 constructions plasmidiques prévues, une double-digestion est effectuée par les enzymes BssHIII et NotI sur le vecteur pCMV β afin d'obtenir un vecteur receveur dans lequel chaque amplicon sera inséré (L4-Tag, L4+Tag, LN10-Tag et LN10+Tag).

Le vecteur utilisé est le pCMV β disponible au laboratoire. Ce plasmide est destiné à une utilisation en cellules eucaryotes puisque muni d'un promoteur dédié pour les cellules de mammifères (CMV ou CytoMégaloVirus).

Le gène *LacZ* (codant pour une β lactamase) et le site BssHIII se situent entre deux sites NotI. Une double-digestion du vecteur par les deux enzymes citées engendre une libération de l'insert *LacZ* fractionné en deux fragments (2454 pb et 818 pb). Une digestion unique par NotI aboutirait à l'obtention de deux fragments de tailles proches (3690 et 3474 pb), difficiles à séparer sur gel d'agarose.

La migration sur gel d'agarose de l'ensemble de la digestion (réparti sur plusieurs puits) permet de séparer le fragment le plus grand (4292 pb) des autres fragments digérés (voir *Partie A de la Figure 35*).

Ce dernier représente le plasmide pCMV libéré du gène *LacZ* et qui nous servira de plasmide receveur pour les amplicons correspondant aux formes courte (L4) et longue (LN10) munies ou dépourvues respectivement du tag HISTIDINE. Ce fragment de 4292 pb est ensuite purifié à partir de la découpe de la bande 4292 pb sur les 7 puits du gel à l'aide d'une mini colonne (Kit "*SV Gel and PCR clean-up System*", *Promega*). Après purification, le plasmide receveur est dosé par spectrophotométrie ($\lambda = 260$ nm) et vérifié sur gel d'agarose (voir *Figure 35 Partie C, puits c*).

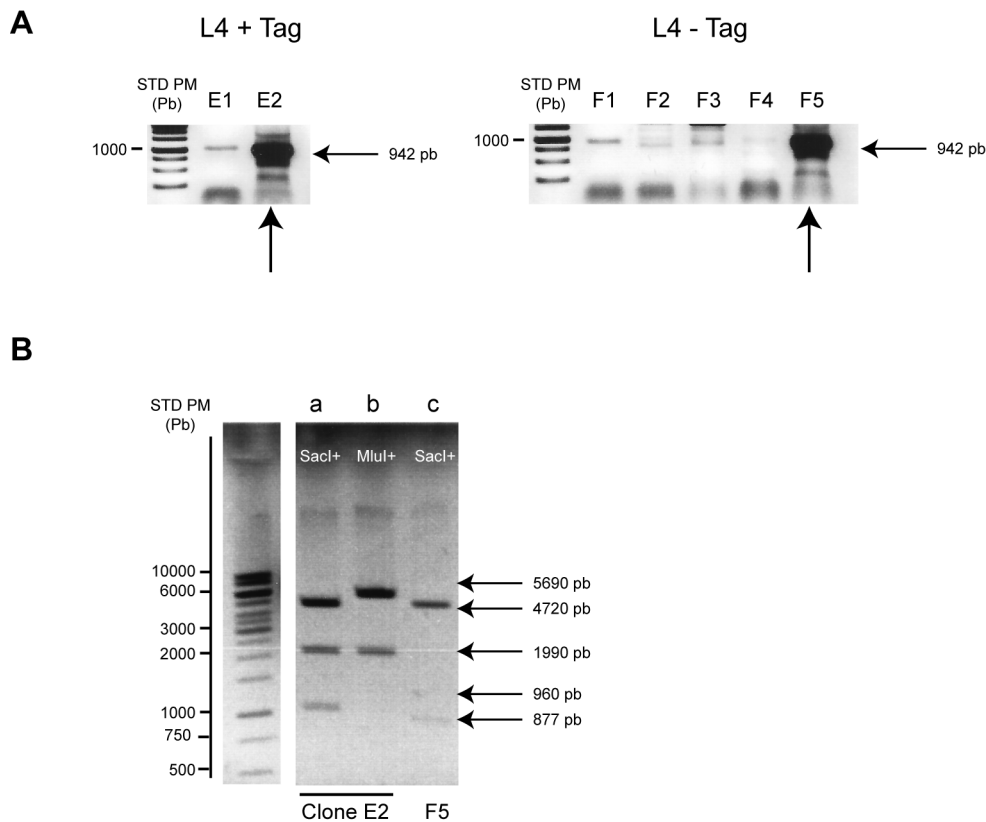


Figure 36 Tri par PCR et digestions contrôles par les ER *Sacl* ou *MluI* pour la sélection de clones bactériens correspondant à la forme courte du transcrit de la 12-lipoxygénase (Forme taguée et non taguée Histidine)

Partie A Test PCR sur plusieurs colonies bactériennes respectivement pour la forme L4+Tag (clones E de la partie gauche) et la forme non taguée (Clones F de la partie droite) du transcrit court de la 12-lipoxygénase.
Utilisation des amorces Sens L4-LN10 PostCMV et Antisens M13 R. L'amplicon obtenu a une longueur de 942 Pb (dans le bon sens d'insertion). Les clones L4+Tag E2 et L4-Tag F5 sont retenus.

Partie B Contrôle des produits de digestion des enzymes *Sacl* et *MluI* sur les 2 clones sélectionnés.
Puits a et b : Digestions du clone E2 (L4+Tag) par *Sacl* et par *MluI*
Puits c : Digestion du clone F5 (L4-Tag) par *Sacl*

2. Vecteurs eucaryotes pCMV avec la forme courte L4 du transcrit de la 12-lipoxygénase

2.1. Synthèse des ADNc de la forme courte L4 (+/- Tag HIS)

Une amplification par PCR à l'aide de la Taq ADN polymérase haute fidélité *Herculase II* (Agilent Biotechnologies) est effectuée à l'aide des couples d'amorces définies au *Tableau 6* (Chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*").

L'amplicon L4 (Forme courte de la 12-lipoxygénase) est synthétisé en deux versions (voir *Partie B de la Figure 35*) :

- muni d'un Tag HISTIDINE, sa taille apparente sur gel d'agarose 1% est de 1998 pb.
- sans Tag HISTIDINE, sa taille apparente sur gel d'agarose 1% est de 1915 pb.

Après digestion des deux amplicons synthétisés par l'enzyme NotI, suivie d'une purification (colonne *Promega*), le contrôle par migration sur gel 1% (voir *Partie C de la Figure 35, puits a et b*) permet de s'assurer que :

- L'amplicon L4+TAG présente une taille diminuée de 8 pb, soit une taille apparente de 1990 pb.
- L'amplicon L4-TAG présente une taille diminuée de 8 pb, soit une taille apparente de 1907 pb.

Cette perte de 8pb est compatible avec la taille attendue de chacun d'entre eux après digestion par l'enzyme NotI.

Les trois réactifs (vecteur receveur pCMV, amplicons L4+TAG et L4-TAG) pour une ligation/transformation bactérienne en *E. coli* souche *DH5α* selon le protocole habituel décrit dans le chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*".

2.2. Contrôle des constructions L4 (+/- Tag HIS)

2.2.1. Sélection de clones et premières analyses

Quelques colonies (ou transformants) sont analysées par PCR à l'aide de la Taq ADN polymérase *Herculase II* (Agilent Biotechnologies) et du couple d'amorces L4-LN10-postCMV / M13F du *Tableau 7* (voir chapitre "*Matériels et Méthodes*"). Les produits d'amplification sont contrôlés par migration sur gel d'agarose 1% (voir *Figure 36 Partie A*) : Seuls 2 clones notés "E" (E1 et E2) pour pCMV L4 avec Tag HIS et 5 clones notés "F" (Clones F1 à F5) pour pCMV L4 sans Tag HIS, sont disponibles.

Les clones E2 et F5 présentent une bande de forte intensité à la taille attendue (942 pb). Nous retenons ces deux clones qui sont mis en culture liquide (5 ml LB/Ampicilline) et une mini-préparation d'extrait de plasmide est réalisée pour chacun d'eux. Il s'ensuit le séquençage de chacun.

La digestion par des enzymes de restriction sur chaque extrait de plasmide (voir *Figure 36 Partie B*) permet de constater :

- pCMV L4+TAG clone E2 subit une digestion par l'ER SacI, contrôlée ensuite par migration sur gel d'agarose. Son profil de digestion doit présenter 2 bandes sur gel d'agarose 1% (4720 et 960 pb). Le clone E2 présente 3 bandes (4720, 1990, 960 pb) (*puits a*). Il existe donc une bande surnuméraire de 1990 pb dont la taille nous fait suggérer la présence d'un deuxième insert L4 avec Tag.

Une nouvelle digestion par l'enzyme MluI est réalisée. Le profil attendu sur la construction théorique doit présenter une bande unique à 5680 pb puisque le plasmide ne doit comporter qu'un site MluI (dans l'insert L4) et se trouver simplement linéarisé. Après digestion par l'enzyme MluI (*puits b*), le contrôle de digestion sur gel permet de constater que le clone E2 présente deux bandes distinctes : 5680 pb et 1990 pb. Nous confirmons donc la présence d'une séquence de 1990 pb surnuméraire.

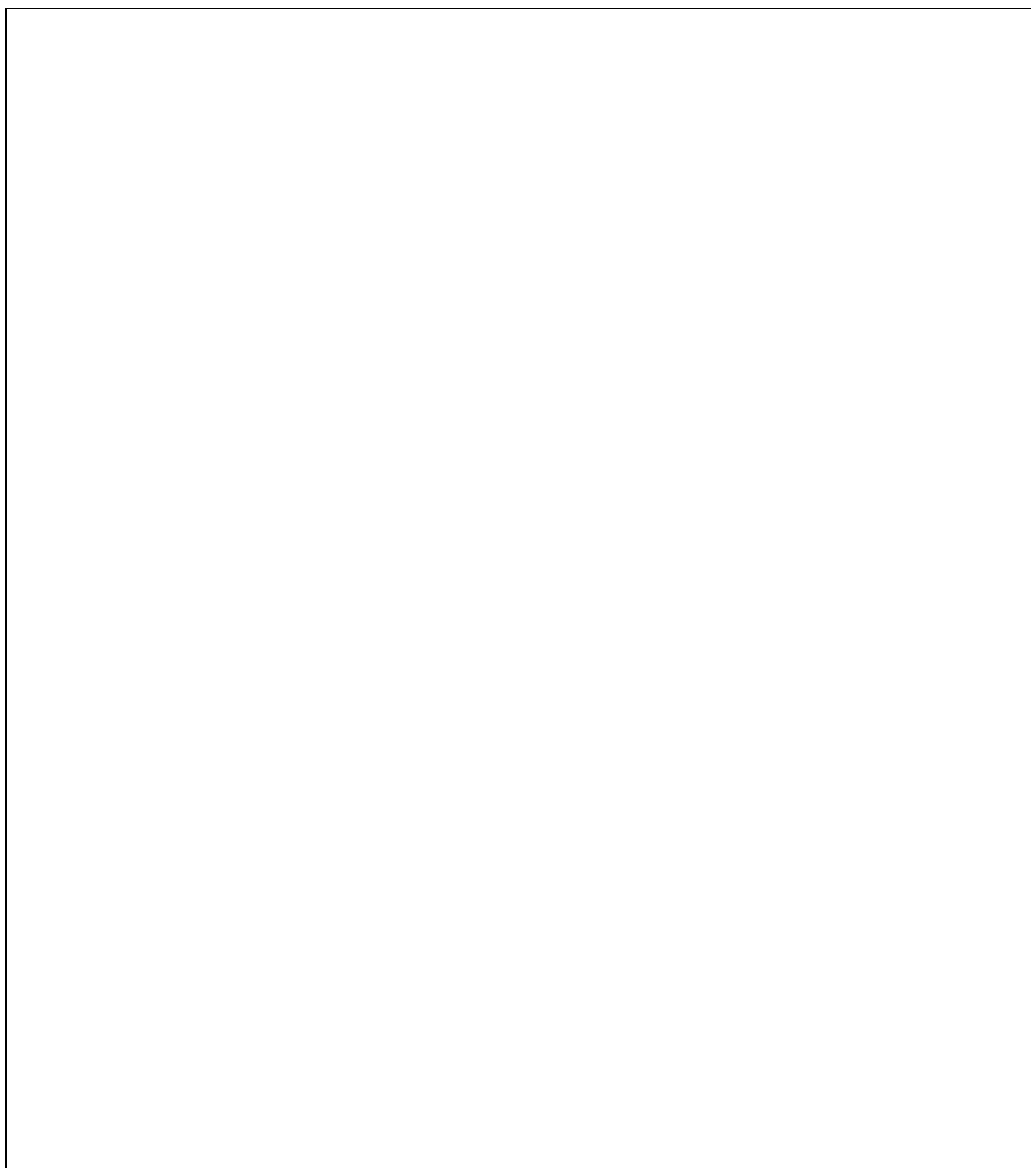


Figure 37 Digestion par *MluI* du plasmide correspondant au clone E2 de la forme courte L4 du transcrit de la 12-lipoxgénase ovine

- | | |
|----------|--|
| Partie A | Représentation de la configuration des inserts L4+Tag en concatémère du clone E2 |
| Partie B | Digestion du plasmide du clone E2 par l'ER <i>MluI</i> . La bande de 1990 Pb représente l'insert surnuméraire à éliminer. La bande principale de 5690 Pb seule sera conservée et purifiée. |
| Partie C | Sélection d'un sous-clone E2 après digestion par <i>MluI</i> , recircularisation par simple ligation de la bande de 5690 Pb obtenue précédemment et transformation. La flèche sous le 1er puits indique le clone E2/01 qui a été retenu après reséquençage. Les croix indiquent les clones à jeter (profil multibandes). |

- pCMV L4-TAG clone F5 subit une digestion par l'enzyme ScaI (Puits c). Le plasmide doit comporter 2 sites de coupure de cette enzyme (dans le promoteur CMV, dans l'insert L4) et son profil de digestion présenter alors 2 bandes sur gel d'agarose 1% (4720 et 877 pb). Nous obtenons ce profil sur gel d'agarose. Le clone F5 semble donc conforme à la construction attendue pour pCMV L4 sans Tag.

Le séquençage de chacun des deux plasmides correspondant aux deux clones obtenus confirme que :

- **Pour le clone E2, nous sommes en présence d'une construction qui doit être corrigée puisque le plasmide contient deux inserts L4 en concatémères, néanmoins correctement orientés dans le vecteur.**

- **Pour le clone F5, la construction pCMV L4 sans Tag clone F5 est conforme à celle attendue, comportant un seul insert de 1915 pb (Sites NotI compris), bien orienté. Une production en grande quantité d'ADN plasmidique du clone F5 (pCMV 12LOX L4-TAG) ("Maxiprep").**

2.2.2. Correction du clone E2 pour la construction L4 avec Tag HIS et premières analyses (voir Figure 37)

Nous avons pu constater que nous sommes en présence d'une construction qui doit être corrigée puisque le plasmide contient deux inserts L4 en concatémères, néanmoins correctement orientés dans le vecteur.

Il nous donc faut éliminer l'un des deux inserts pour n'en conserver qu'un seul.

Une digestion est faite par l'enzyme de restriction MluI (site unique de coupure en début d'insert L4 (Voir Figure 37, Partie A). Les extrémités obtenues sont débordantes. Par complémentarité des bases, une ligation par la T4 DNA Ligase permet de rassembler les extrémités créées de façon à reconstituer à la base près un insert unique correspondant à la forme courte L4 de la 12-lipoxygénase.

La totalité du produit de digestion par MluI est contrôlé sur gel d'agarose 1% (Voir Figure 37, Partie B), répartie sur 5 puits. Cela permet de vérifier qu'il y a bien libération d'un morceau de séquence de 1990pb (équivalent à un insert entier). Le fragment le plus long (5690 pb) est donc constitué du plasmide pCMV entier avec un insert L4, linéarisé. Ce fragment sera conservé et une ligation par la T4 DNA Ligase permettra de recirculariser le plasmide.

Après transformation de bactéries *E. coli* DH5 α , une sélection d'une douzaine de colonies est faite, chacune est individuellement repiquée en milieu liquide LB / Ampicilline et une extraction de plasmides correspondant à chaque culture est effectuée.

Une digestion par l'enzyme MluI sur 1 μ g de chaque extrait, contrôlée par migration sur gel d'agarose 1% permet de s'assurer qu'un seul fragment de 877 pb est libéré, le plasmide linéarisé étant visible à 4720 pb (voir Figure 37 Partie C). Seuls les clones E2/02 et E2/05 (marqués d'une croix sur l'image) semblent avoir subi une digestion incomplète puisque qu'une bande reste visible aux alentours de 6000pb.

Nous retenons le clone E2/01 pour la forme corrigée de la construction pCMV 12LOX L4+TAG. Ce clone a été séquencé et la correction est confirmée : il présente un insert L4 unique, avec une séquence intègre.

Une production en grande quantité d'ADN plasmidique du clone E2/01 sera effectuée ("Maxiprep").

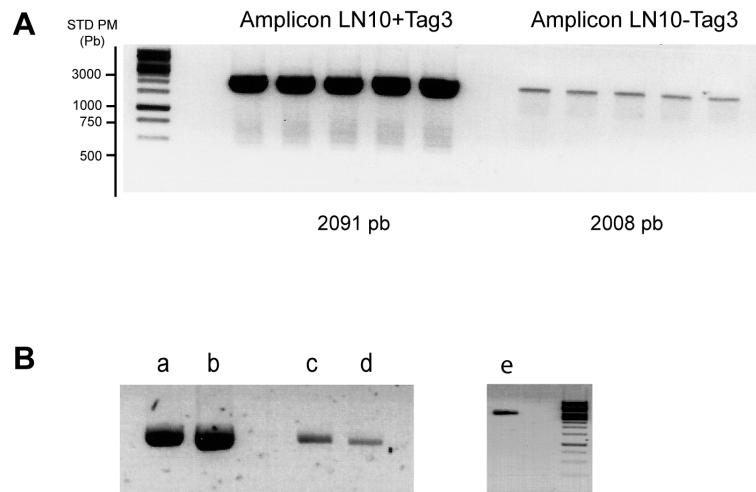


Figure 38 Synthèse des amplicons LN10 +/- TAG3 et digestion par l'enzyme de restriction *NotI*

Partie A Synthèse des ADNc correspondant à la forme normale du transcrit LN10 de la 12-Lipoxygénase. L'amplicon de 2008 Pb correspond à la forme sans Tag Histidine, celui de 2091 Pb à la forme taguée.

Partie B Contrôle sur gel d'agarose 1% des digestions par *NotI* (amplicons et vecteur receveur pCMV β)

Puits a Amplicon LN10 + TAG3 non digéré
 Puits b Amplicon LN10 + TAG3 digéré
 Puits c Amplicon LN10 - TAG3 non digéré
 Puits d Amplicon LN10 - TAG3 digéré
 Puits e Vecteur pCMV β bande 4292 Pb digérée

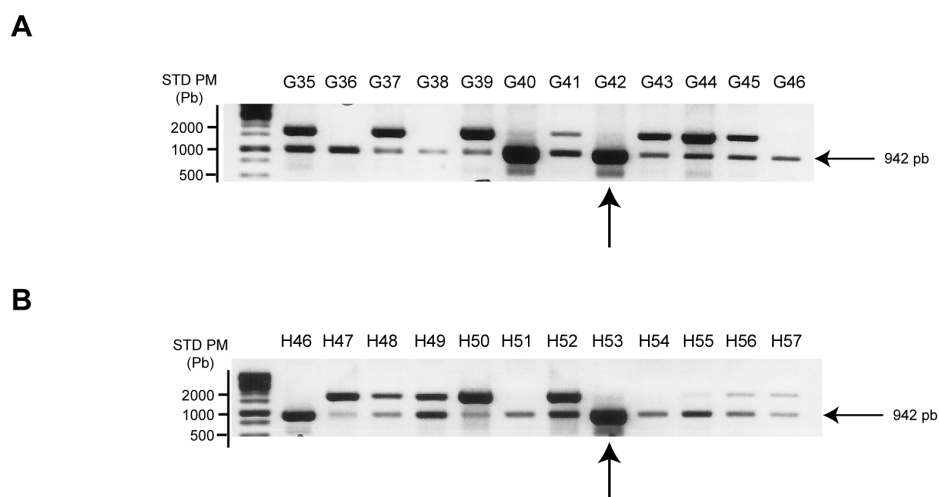


Figure 39 Tri par PCR de clones bactériens correspondant à la forme normale LN10 du transcrit de la 12-lipoxygénase (Forme taguée et non taguée Histidine)

Test PCR sur plusieurs colonies bactériennes respectivement pour la forme taguée LN10+Tag3 (clones G de la partie A) et la forme non taguée LN10-Tag3 (Clones H de la partie B) du transcrit normal de la 12-lipoxygénase.

Utilisation des amorces Sens L4-LN10 PostCMV et Antisens M13 R. L'amplicon obtenu a une longueur de 942 Pb (dans le bon sens d'insertion). Les clones LN10+Tag3 G42 et LN10-Tag3 H53 sont retenus (indiqués par les flèches sous chaque partie).

3. Vecteurs eucaryotes pCMV avec la forme LN10 longue du transcrit de la 12-lipoxygénase

3.1. Synthèse des ADNc de la forme normale LN10 (+/- Tag HIS)

Une amplification par PCR à l'aide de la Taq ADN polymérase haute fidélité *Herculase II* (*Agilent Biotechnologies*) est effectuée à l'aide des couples d'amorces définies au *Tableau 6* (*Chapitre "B/ Matériels et Méthodes"*).

L'amplicon LN10 est synthétisé en deux versions (voir *Partie A de la Figure 38*) :

- muni d'un Tag HISTIDINE, sa taille apparente sur gel d'agarose 1% est de 2091 pb.
- sans Tag HISTIDINE, sa taille apparente sur gel d'agarose 1% est de 2008 pb.

Après digestion des deux amplicons synthétisés par l'enzyme NotI, suivie d'une purification (colonne *Promega*), le contrôle par migration sur gel 1% (voir *Partie B de la Figure 38*) permet de s'assurer que :

- L'amplicon correspondant à la forme normale LN10 de la 12-lipoxygénase munie d'un Tag HISTIDINE présente une taille diminuée de 8 pb, soit une taille apparente de 2083 pb (*puits b* comparé au contrôle non digéré dans le *puits a*).
- L'amplicon correspondant à la forme normale LN10 de la 12-lipoxygénase sans Tag HISTIDINE présente une taille diminuée de 8 pb, soit une taille apparente de 2000 pb (*puits d* comparé au contrôle non digéré dans le *puits c*).

Cette perte de 8pb est compatible avec la taille attendue de chacun d'entre eux après digestion par l'enzyme NotI.

Le *puits e* présente la bande haute du vecteur receveur (4292pb) post-digestion par NotI et purification sur colonne (*Promega*). Il s'agit ici d'un simple contrôle du vecteur receveur purifié afin de s'assurer que nous n'avons pas perdu ce vecteur au cours de la purification.

Les trois réactifs (vecteur receveur pCMV, amplicons LN10+TAG3 et LN10-TAG3) sont disponibles pour une ligation/transformation bactérienne en *E. coli* souche DH5 α selon le protocole habituel (non décrit ici).

3.2. Contrôle des constructions LN10 (+/- Tag HIS)

Suite à la ligation des amplicons LN10 (+/- Tag HISTIDINE) avec le vecteur receveur pCMV (bande de 4292 pb) post-digestion NotI, purification et transformation de bactéries *E. coli* DH5 α , quelques dizaines de colonies sont analysées par PCR à l'aide de la Taq ADN polymérase *Herculase II* (*Agilent Biotechnologies*) et du couple d'amorces L4-LN10-postCMV / M13F du *Tableau 7* (voir *chapitre "Matériels et Méthodes"*). Les amplicons ont été déposés pour contrôle sur gel d'agarose 1% (voir *Figure 39*).

La *Partie A* représente le tri de 12 clones nommés G35 à G46. Ces clones correspondent à la construction pCMV LN10 avec Tag HIS).

La *Partie B* représente le tri de 12 clones nommés H46 à H57. Ces clones correspondent à la construction pCMV LN10 sans Tag HIS)

Pour les deux cas, les clones contrôlés ici présentent tous une bande apparente à la taille de 942 pb. Pour chacune des constructions, nous retenons un clone à amplicon unique à la taille de 942 pb, marqué d'une flèche sur chacune des figures :

- Clone G42 pour la construction pCMV LN10 avec Tag HIS (*Figure 39 Partie A*),
- Clone H53 pour la construction pCMV LN10 sans Tag HIS (*Figure 39 Partie B*).

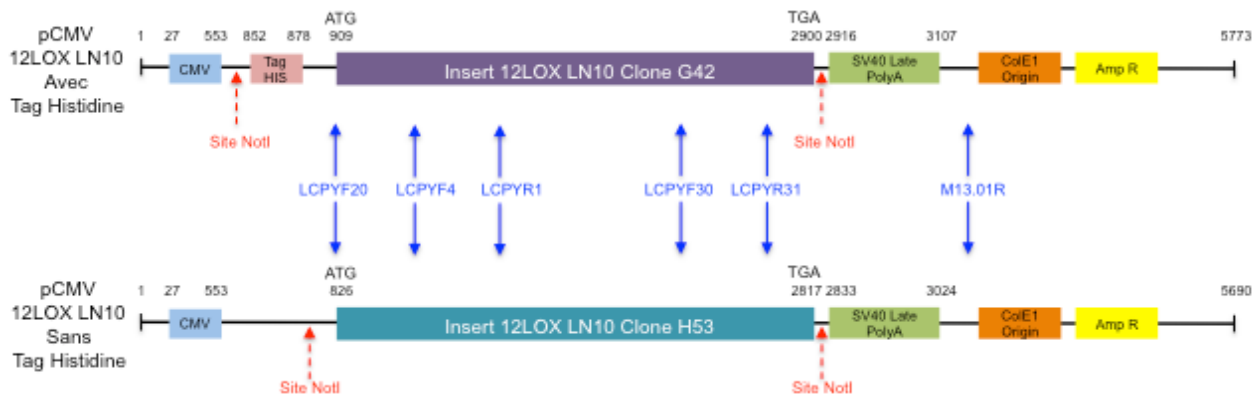


Figure 40 Positionnement des amorces utilisées pour le séquençage des deux constructions pCMV 12LOX de la forme longue LN10 (Clone G42 avec Tag HIS, Clone H53 sans Tag HIS)

Les flèches bleues indiquent la position de chacune des amorces utilisées.

Tableau 11 Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage

Nom de l'amorce	Type d'amorce	Séquence de l'amorce 5' ---> 3'
LCPYF4	Sens	GACCGCATCACGGTGCA
LCPYR1	Antisens	CTCCAGACTGGTCCAGGAGC
M13.01R	Antisens	CAGGAAACAGCTATGAC
LCPYF30	Sens	AGTGGAAGCTGCTACCCATGGT
LCPYF20	Sens	ATGGGCCGCTACCGCATCCTC
LCPYR31	Antisens	ATCACGGTGGCCATTGTACAT

Le séquençage, de chacun des deux plasmides correspondant aux deux clones obtenus, par 6 amorces oligonucléotidiques différentes, permet de couvrir l'ensemble de la séquence de l'insert avec zones de recouvrement.

Après mise en culture liquide de chacune de ces colonies retenues et une mini-préparation d'extrait de plasmide, un séquençage de chaque extrait de plasmide est réalisé à l'aide de 6 amorces oligonucléotidiques différentes permettant de couvrir l'ensemble de la séquence de chaque insert (voir *Figure 40 et Tableau 11*).

Le séquençage confirme les informations suivantes :

- Le clone pCMV 12LOX LN10 avec Tag G42 comporte plusieurs mutations en position 1273 (A-->G), 1313 (T-->C), 1501 (C-->T), 2199 (C-->A), 2258 (A-->C), 2258 (G -->C) et 2355 (A-->G)

- Le clone pCMV 12LOX LN10 sans Tag H53, quant à lui, présente également des mutations en position 1165 (G-->A), 1190 (A-->G), 1418 (C-->T), 2116 (C-->A), 2175 (T-->G) et 2272 (A-->G)

Les résultats de séquençages ont révélé la présence de plusieurs mutations au sein de la séquence codante LN10 pour chacun des deux clones.

L'utilisation d'une Taq ADN polymérase Haute fidélité *Herculase II* ne peut pas être à l'origine de telles erreurs. En reprenant la séquence originelle de la construction *pET-16b* LN10 clone 22 obtenue en expérimentation sur procaryotes, nous avons constaté que cette dernière comporte des erreurs et est donc non conforme à la toute première construction en *pGEM®-T Easy* LN10 Clone 03. L'utilisation de Taq ADN polymérases à différents niveaux pour la production des inserts LN10 à partir de la construction en *pET-16b* n'a probablement pas permis d'assurer une conformité à 100% également. Le clone *pGEM®-T Easy* LN10/03 avait préalablement été séquencé et la relecture "à l'œil" des séquences obtenues ont confirmé les résultats du séquenceur.

Face à ce problème, nous décidons d'adopter une nouvelle stratégie :

=> Repartir des clones pCMV_LN10+TAG3 et pCMV_LN10-TAG3 ainsi que du clone d'origine pGEM®-T Easy_LN10 clone 03 (voir point suivant c-).

3.3. Correction des mutations par extraction/remplacement d'une partie de séquence

Afin de s'affranchir des mutations nombreuses constatées après séquençage des 2 constructions pCMV 12LOX LN10 (+/- TAG3), nous décidons de les corriger en remplaçant une partie de la séquence codante du plasmide pCMV (partie centrale) par une séquence dépourvue de mutation dans le plasmide *pGEM®-T Easy* originel. Cette partie "saine" reste commune aux deux constructions à modifier.

Après une double-digestion par les Enzymes BgIII et MluI, présentant des sites uniques dans les séquences codantes des constructions pCMV et du plasmide d'origine *pGEM®-T Easy* LN10 Clone 03, un contrôle des produits de digestion par migration sur gel d'agarose 1 % est effectué (voir *Partie A de la Figure 41*) :

Ainsi, nous observons pour

* Le plasmide donneur (plasmide *pGEM®-T Easy* 12LOX LN10 Clone 03) (partie gauche de la *Figure 41 A*). La digestion unique par BgIII engendre une linéarisation du plasmide de 5848 pb. La double digestion (BgIII/MluI) génère 3 fragments (3221 pb, 1666 pb et 961 pb). **Seul le fragment 1666 pb sera conservé** et purifié afin de remplacer le fragment muté.

* Les mêmes digestions réalisées sur les deux plasmides mutés pCMV LN10 (partie droite de la *Figure 41 A*), permettent d'observer une linéarisation du plasmide de 5773 pb (pour pCMV 12LOX LN10 avec Tag) et de 5690 pb (pour pCMV 12LOX LN10 sans Tag) après digestion unique par BgIII. La double digestion (BgIII/MluI) génère 2 autres fragments respectivement pour pCMV 12LOX LN10

- avec Tag : 4107 pb, 1666 pb. **Le fragment 4107 pb sera conservé**, purifié et lié à l'amplicon LN10+TAG3 avant transformation de bactéries.

- sans Tag : 4024 pb, 1666 pb. **Le fragment 4024 pb sera conservé**, purifié et lié à l'amplicon LN10-TAG3 avant transformation de bactéries.

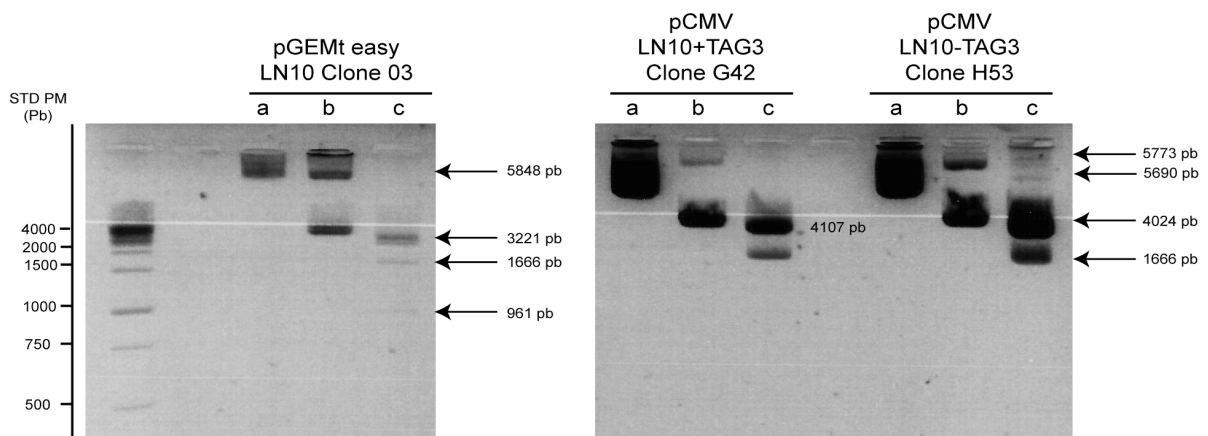
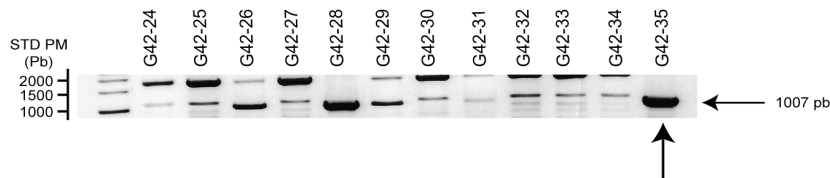
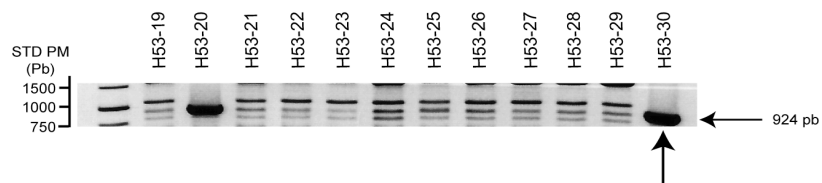
A**B****C**

Figure 41 Correction des mutations par digestion/remplacement pour chacun des 2 plasmides de clones retenus pour la surexpression de la forme normale du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine (constructions LN10 +/- TAG3)

Partie A Digestions par les enzymes BglIII (puits b) ou BglIII + MluI (Puits c) du plasmide donneur *pGEM®-T Easy* LN10 Clone 03 (1ère partie d'image à gauche) et des plasmides à corriger (*pCMV LN10+TAG3* Clone G42 et *pCMV LN10-TAG3* clone H53) (2ème partie d'image à droite). Les puits annotés "a" représentent les plasmides respectifs non digérés.

Partie B Test PCR sur une douzaine de colonies bactériennes issues de la forme LN10+Tag3 corrigée par remplacement (clones G42, colonies N°24 à 35)

Partie C Test PCR sur une douzaine de colonies bactériennes issues de la forme LN10-Tag3 corrigée par remplacement (clones H53, colonies N°19 à 30)

Utilisation des amorces Sens L4-LN10 PostCMV et Antisens M13 R. L'amplicon obtenu a une longueur de 1007 Pb pour les clones G42 corrigés (Forme normale du transcrit de la 12-LOX) et 924 Pb pour les clones H53 corrigés (Forme courte du transcrit de la 12-LOX).

Les clones LN10+Tag3 G42/35 et LN10-Tag3 H53/30 sont retenus.

3.4. Contrôle des constructions LN10 (+/- Tag HIS)

Une soixantaine de colonies (ou transformants) ont été analysées par PCR sur colonies (utilisation de la Taq ADN polymérase *Herculase II (Agilent Biotechnologies)* et du couple d'amorces utilisées du *Tableau 7 du chapitre "Matériels et Méthodes"*). Les amplicons ont été déposés pour contrôle sur gel d'agarose 1% (voir *Figure 41 Parties B et C*).

La *Partie B* représente le tri de 12 sous-clones G42 modifiés (nommés G42-24 à G42-35) correspondant à la construction pCMV LN10 avec Tag3 HIS). Les clones contrôlés ici présentent tous une bande apparente à la taille de 1007 pb.

Seuls les clones présentant une bande à forte intensité seront retenus (nous choisissons le dernier clone G42-35).

La *Partie C* représente le tri de 12 sous-clones H53 modifiés (nommés H53-19 à H53-30) correspondant à la construction pCMV LN10 sans Tag3 HIS). Les clones contrôlés ici présentent tous une bande apparente à la taille de 924 pb.

Seuls les clones présentant une bande à forte intensité seront retenus (nous choisissons le dernier clone H53-30).

Après mise en culture liquide de chacune de ces colonies retenues et une mini-préparation d'extrait de plasmide, un séquençage de chaque extrait de plasmide est réalisé à l'aide de 3 amorces oligonucléotidiques différentes permettant de couvrir la zone de séquence remplacée pour chaque insert (voir *Tableau 12*).

Tableau 12 Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage des constructions pCMV 12LOX LN10 +/- TAG3 après correction des mutations par extraction/remplacement d'une partie de séquence

Nom de l'amorce	Type d'amorce	Séquence de l'amorce 5' ----> 3'
LCPYF4	Sens	GACCGCATCACGGTGCA
LCPYF20	Sens	ATGGGCCGCTACCGCATCCTC
LCPYR31	Antisens	ATCACGGTGGCCATTGTCACAT

Le séquençage confirme les informations suivantes :

- L'extraction/remplacement d'une portion de l'insert pour chaque construction a été faite,
- **Les deux plasmides pCMV modifiés présentent tous deux une mutation unique en position 1467 (T > C).**

Cette mutation ne peut être due au hasard. Le plasmide à l'origine est le *pGEM®-T Easy 12 LOX LN10 Clone 03* dont une portion de 1666 pb a été conservée pour le remplacement en vecteurs pCMV des clones à corriger. Afin de s'assurer de la présence de cette mutation, le plasmide *pGEM®-T Easy LN10 Clone 03* est envoyé au séquençage avec 3 amorces oligonucléotidiques (voir *Tableau 12*).

La mutation est confirmée : Le plasmide pGEM®-T Easy LN10 clone 03 d'origine la présente en position 658 de sa séquence entière.

Tableau 13 Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage des constructions pCMV 12LOX LN10 +/- TAG3 après correction des plasmides par mutagenèse dirigée

Nom de l'amorce	Type d'amorce	Séquence de l'amorce 5' ---> 3'
P6F	Sens	TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTA
M13.01F	Sens	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13.01R	Antisens	CAGGAAACAGCTATGAC
P5F	Sens	GAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTG
LCPYF20	Sens	ATGGGCCGCTACCGCATCCTC
P4R	Antisens	GCGCAGCCCCACCTCAGTGATCTCCC

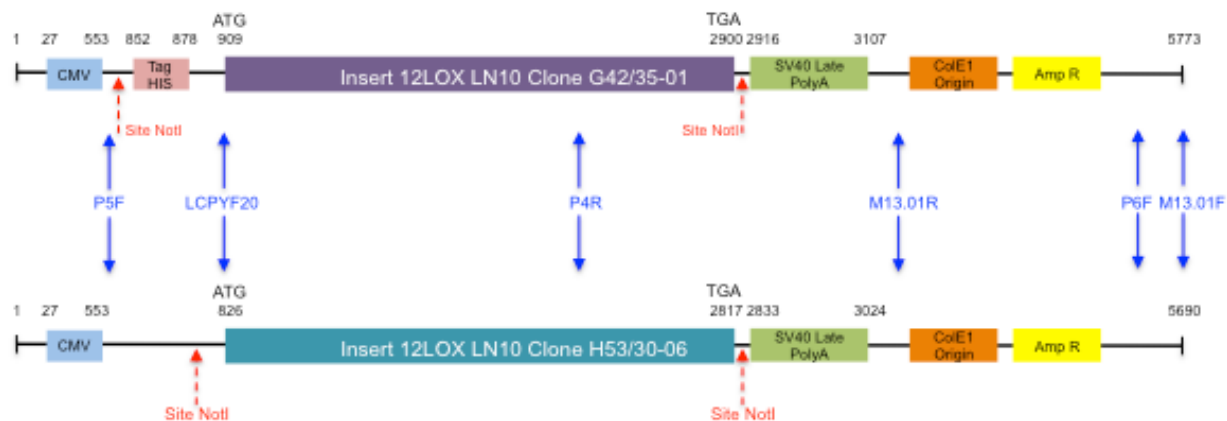


Figure 42 Positionnement des amorces utilisées pour le séquençage des deux constructions pCMV 12LOX de la forme longue LN10 (Clone G42 avec Tag HIS, Clone H53 sans Tag HIS), après correction par mutagenèse dirigée

Les flèches bleues indiquent la position de chacune des amorces utilisées.

3.5. Correction d'une mutation unique par mutagenèse dirigée

Il nous faut donc remplacer la base défailante (T) par la bonne base (C) dans les constructions plasmidiques pCMV LN10+/- TAG3 modifiées. Si cette modification n'est pas effectuée, l'acide aminé codé à cet emplacement sera changé. Cela peut alors impliquer un changement de conformation des protéines recombinantes synthétisées avec chacune des constructions en question, ce qui peut avoir un impact sur l'activité biologique de ces protéines. Compte tenu de la position de la mutation en début de séquence de l'insert, il paraît plus simple d'utiliser un Kit "*Thermo Scientific Phusion Site-directed Mutagenesis Kit*" (*ThermoFisher*). Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour les corrections sont décrites dans le *Tableau 8 du chapitre "B/ Matériels et Méthodes"*.

Deux extraits sont sélectionnés pour le séquençage :

pCMV 12LOX LN10 Clone **G42/35-01**

pCMV 12LOX LN10 Clone **H53/30-06**

La procédure suivie est décrite dans le chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*".

Le séquençage confirme la correction de la mutation suite à l'alignement des séquences obtenues avec la séquence attendue. 6 séquençages sont effectués pour chaque construction, permettant ainsi de reconstituer la totalité de chaque insert (Voir *Figure 42 et Tableau 13*)

La mutation observée pour chaque construction a bien été corrigée : Le séquençage confirme la correction de la mutation suite à l'alignement des séquences obtenues avec la séquence attendue.

Une production de plasmides des deux sous-clones est effectuée en grande quantité ("*Midiprep*") dans l'objectif des expérimentations par transfection transitoire de cellules COS-7 à venir.

B- Transfection transitoire de cellules COS-7 avec les constructions pCMV avec/sans Tag Histidine

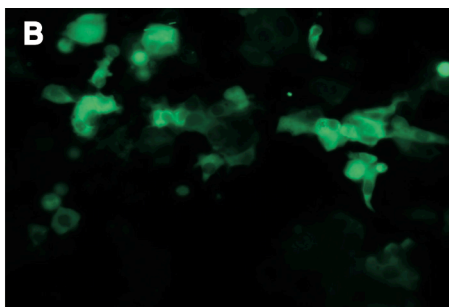
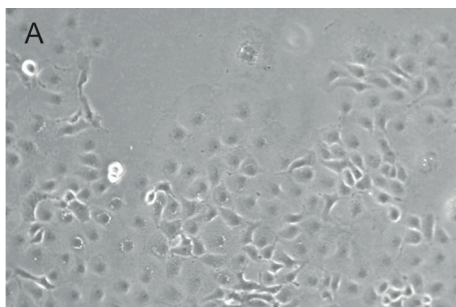
1. Analyse des cellules COS-7 par Immunocytochimie

Des cellules eucaryotes de lignée COS-7 (cellules fibroblastiques de rein de singe vert) ont été utilisées pour les expérimentations de transfection transitoire (voir *Figure 43*).

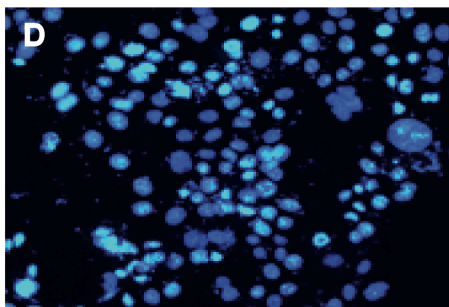
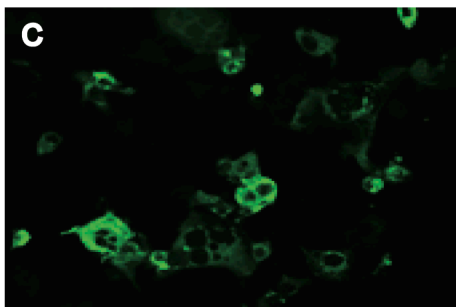
Les cellules COS-7 ont été cultivées sur lamelles de verre jusqu'à une confluence à 80% (*Photo A*) puis transfectées pendant 24h à l'aide de l'agent lipofectant *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* © *ROCHE* (0.5µg plasmide/1µL transfectant/50µl milieu).

La transfectabilité des cellules utilisées a été contrôlée par transfection avec un plasmide Contrôle porteur du gène *GFP* (*pmaxGFP™*, 3,5 Kb, *Amara Nucleofactor® Technology, Lonza*) (*Photo B*). La fluorescence des cellules atteste de la capacité de celles-ci à recevoir un plasmide et à exprimer un gène interne (ici *GFP*).

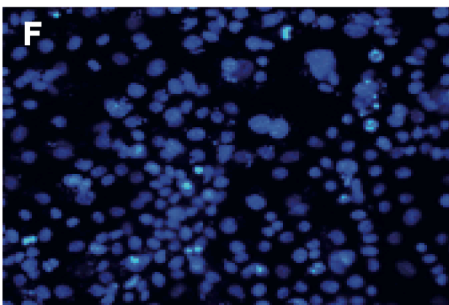
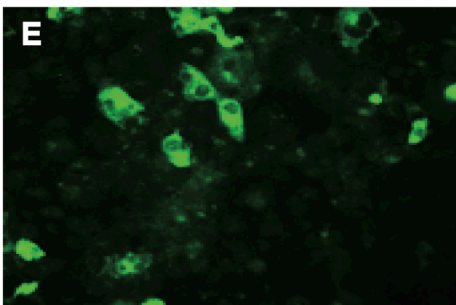
Contrôles cellules
COS-7



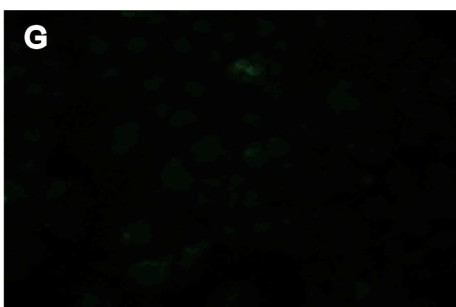
Cellules transfectées
avec pCMV L4



Cellules transfectées
avec pCMV LN10



Contrôles plasmides



(Photos de P. Reinaud - UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France)

Figure 43 Recherche des 2 formes de protéines recombinantes 12-lipoxygénase ovine produites en cellules COS-7 transfectées par les plasmides pCMV L4 ou pCMV LN10. Mise en évidence par immunofluorescence post-fixation au paraformaldéhyde 4%.

Les cellules COS-7 ont été ensemencées sur lamelles de verre (Diamètre 12 mm) et cultivées jusqu'à une confluence à 80% (Photo A). Une coloration nucléaire au DAPI a été faite afin de s'assurer de la confluence souhaitée des cellules. La transfection des cellules s'est faite pendant 24h à l'aide de l'agent lipofectant X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent © ROCHE (0.5µg plasmide/1µL transfectant/50µl milieu).

Un contrôle préalable de transfectabilité des cellules utilisées a été mené avec le vecteur commercial pGFPmax™ (Photo B).

Les immunosérums entiers de lapins anti-L4 (forme courte 12-LOX) et anti-LN10 (forme normale 12-LOX) ont été utilisés à une dilution au 1/500^{ème} (Respectivement Photos C et E). La révélation a été faite à l'aide d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé au FITC.

Des transfections «contrôles plasmides» (pCMVβ sans insert L4 en Photo G, ni insert LN10 en Photo H) ont été menées afin de s'assurer qu'aucun signal ne soit visible (hors expression liée au transcrite de la 12-lipoxygénase). Les contre-colorations ne sont pas montrées ici. De la même manière, des cellules COS-7 non transfectées ont été traitées en immunofluorescence avec les immunosérums spécifiques L4 et LN10 afin de s'assurer de l'absence de toute protéine 12-lipoxygénase d'origine endogène (non montrées ici).

Entre 20 et 40% des cellules transfectées produisent les protéines recherchées (L4, LN10 respectivement). Le signal détecté en fluorescence verte est bien spécifique avec les immunosérums de lapins utilisés (contrôles plasmides sans signal).

Des cellules COS-7 ont été transfectées à l'aide de la construction pCMV 12LOX L4 (forme courte avec TAG HIS, clone E2-01, *Photo C*). L'immunsérum anti-peptide L4 de lapin (nommé 12LOX L4 L345), associé à un anticorps secondaire anti-lapin couplé FITC, a permis de mettre en évidence la présence de protéines recombinantes 12-lipoxygénase de forme courte L4 dans 20 à 40% des cellules transfectées (cellules colorées en vert). Une coloration nucléaire au DAPI a été faite afin de contrôler la densité de cellules et le pourcentage de transfection (*Photo D*).

De la même manière, des cellules COS-7 ont été transfectées à l'aide de la construction pCMV 12LOX LN10 (forme normale avec TAG HIS, clone LN10 G42/35-01, *Photo E*). L'immunsérum anti-peptide LN10 de lapin (nommé 12LOX LN10 L347), associé à un anticorps secondaire anti-lapin couplé FITC, a également permis de mettre en évidence la présence de protéines recombinantes 12-lipoxygénase de forme normale LN10 dans 20 à 40% des cellules transfectées (cellules colorées en vert). Une coloration nucléaire au DAPI a été faite afin de contrôler la densité de cellules et le pourcentage de transfection (*Photo F*).

Les cellules COS-7 ont été contrôlées après transfection par le plasmide pCMV β seul (*Photos G et H*). Ce test a permis de vérifier que les cellules transfectées par le vecteur vide ne présentent aucune fluorescence non spécifiques avec les anticorps utilisés (respectivement l'immunsérum anti-12LOX L4, et l'immunsérum anti-12LOX LN10).

Nous avons donc obtenu des cellules eucaryotes capables de produire des protéines recombinantes 12-lipoxygénase, de forme courte L4 ou normale LN10, chacune reconnue par l'anti-peptide qui lui correspond. Les cellules COS-7 ne présentent pas de niveau endogène de 12-lipoxygénase. Les cellules COS-7 ainsi transfectées sont produites en quantité suffisante pour envisager diverses expérimentations à venir :

- i. Caractérisation des immunsérums de lapins anti-peptides (L4, LN10),
- ii. Production de protéines recombinantes 12-LOX L4 et LN10, purification par chromatographie d'affinité (soit par le Tag HISTIDINE, soit par le Peptide spécifique),
- iii. Tests d'activité enzymatique des protéines produites.

Les travaux qui figurent dans les pages suivantes concernent ces aspects.

2. Recherche et analyse des protéines recombinantes synthétisées sur extraits cellulaires entiers de COS-7 - Caractérisation des immunsérums de lapins anti-peptides

Nous avons vu au point précédent que les cellules COS-7 ont été transfectées par les constructions plasmidiques eucaryotes corrigées pCMV 12LOX (L4 ou LN10 avec Tag HISTIDINE). Les cellules montrent leur capacité à produire les protéines recombinantes 12-lipoxygénase pour chacune des formes (normale LN10, courte L4). La surexpression de cette protéine 12-lipoxygénase permet d'obtenir des quantités importantes de cette dernière dans le cytosol des cellules productrices. La 12-lipoxygénase native, exprimée au sein du tissu endométrial de brebis (épithélium luminal, épithélium glandulaire) ne peut être extraite directement à partir de ce tissu. Le recours à la surexpression en lignée de cellules eucaryotes telles les COS-7 nous permet d'envisager une extraction plus aisée des protéines produites à partir de cellules COS-7 transfectées afin de tester leur activité biologique *in vitro*.

Nous procédons à une extraction des protéines totales de cellules COS-7, 24h après transfection. (voir Chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*"). Les extraits de protéines totales sont utilisés :

- pour caractériser les immunsérums de lapin anti-peptides (L4, LN10) que nous avons obtenus par immunisation de lapins (voir chapitre "*Matériels et Méthodes*"),
- pour rechercher les protéines 12-lipoxygénase dans l'endomètre ovin.

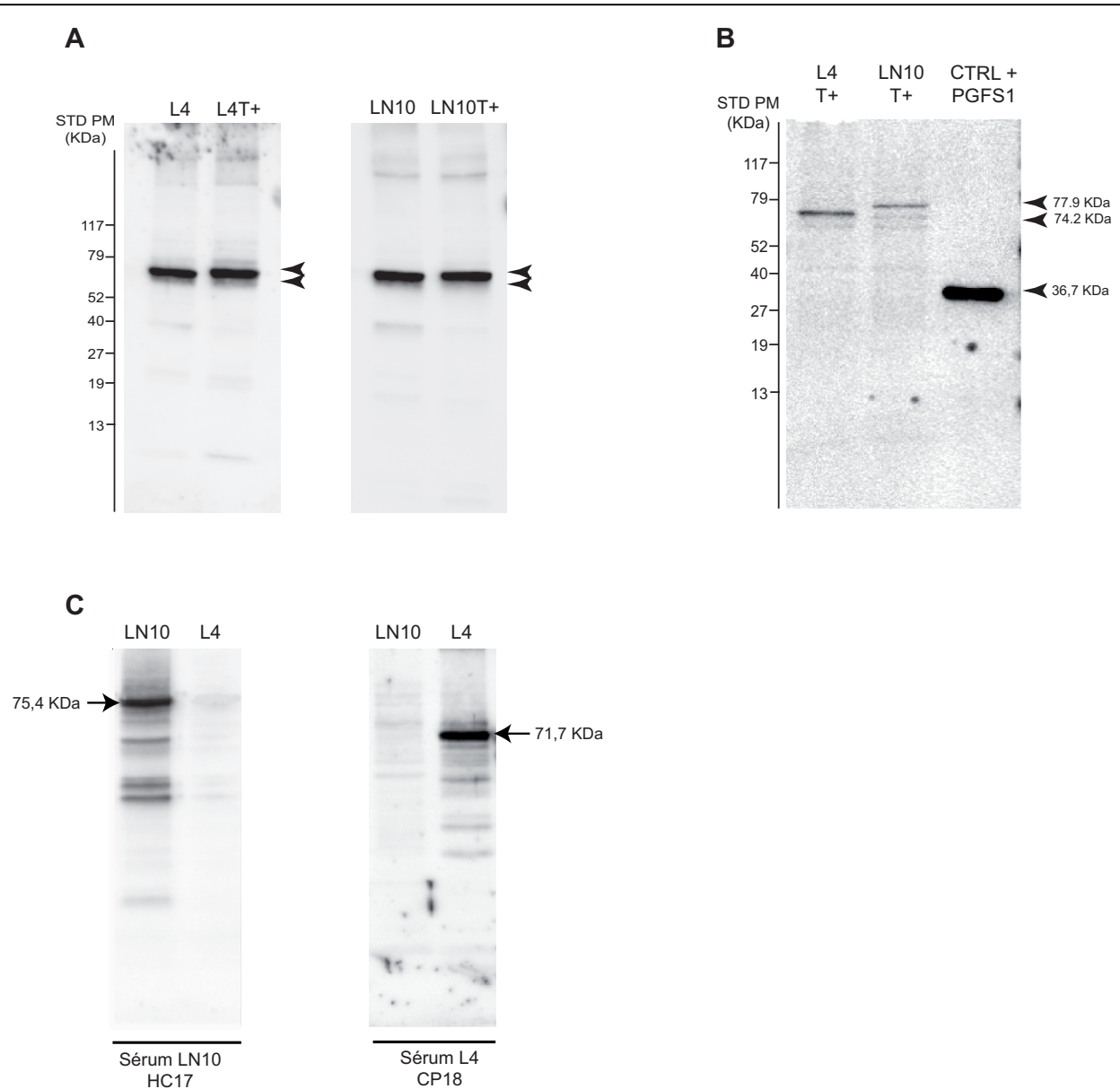


Figure 44 Détection des protéines recombinantes 12-lipoxygénases (forme courte L4 et forme normale LN10) dans les cellules COS-7 transfectées par les plasmides pCMV 12LOX. Western blot sur des extraits totaux de protéines (10 μ g par puits).

- A- Détection des protéines recombinantes en utilisant les sérums anti-peptides L4 et LN10 sur des extraits de COS-7 transfectées avec les formes respectives sans ou avec Tag Histidine (T+)
- B- Détection des protéines recombinantes 12-lipoxygénases taguées avec un anticorps anti-HIS Tag (Une protéine purifiée taguée Histidine (PGFS1) disponible au laboratoire a été introduite comme témoin de fonctionnement de l'anticorps utilisé)
- C- Spécificité des immunosérums anti-peptides L4 et LN10

Les protéines recombinantes 12-lipoxygénase (forme courte L4 comme forme normale LN10) sont reconnues par les immunosérums anti-peptides respectifs, les formes taguées et non taguées de chaque protéines sont détectées par ces anti-peptides respectivement (Figure A).

Les tailles observées sur chaque membrane de western blot sont comparables aux tailles attendues

L4 (632 aa)= 71,7 KDa

L4 T+ (653 aa) = 74,2 KDa

LN10 (663 aa)= 75,4 KDa

LN10 T+ (684 aa)= 77,9 KDa

Le calcul de la taille des protéines taguées Histidine (T+) et non taguées est fait via une application dédiée (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>)

Les cellules COS-7 transfectées respectivement avec le plasmide pCMV codant pour chacune des formes en version taguée, produisent les protéines recombinantes reconnues par l'anticorps anti-His tag. La différence de taille entre les deux formes de 12-lipoxygénases est ici bien visible sur ce blot (Figure B).

2.1. Caractérisation des sérums anti-peptides LN10 et L4

La caractérisation des sérums se fait grâce à des analyses par Western Blot à partir des extraits de protéines totales de cellules COS-7 (10µg d'extrait) (voir *Figure 44*) :

L4 Cellules transfectées avec pCMV L4 (clone F5)

L4T+ Cellules transfectées avec pCMV L4 avec Tag (sous-clone E2-01)

LN10 Cellules transfectées avec pCMV LN10 (sous-clone H53/30-06)

LN10T+ Cellules transfectées avec pCMV LN10 (sous-clone G42/35-01).

Remarque : Les deux sérums anti-peptide L4 ou LN10 testés sur des cellules COS-7 non transfectées ou transfectées avec le plasmide pCMVβ vide ne détectent aucune protéine dans ces échantillons : **les cellules COS-7 utilisées pour les transfections ne produisent pas de 12-lipoxygénase endogène détectable** par les deux anti-peptides de lapin (donnée non montrée ici).

Nous montrons ici les résultats obtenus pour les pré-tests sur deux immunsérums, chacun correspondant à un peptide spécifique (peptide L4 CP18, peptide LN10 HC17). Dans un premier temps, la capacité des immunsérums à reconnaître les peptides contre lesquels ils sont dirigés a été évaluée. Dans un deuxième temps, un test d'immunoneutralisation des IgG spécifiques de chaque sérum par le peptide correspondant a été mené. Ces évaluations ont été faites par Western blot (Détails du protocole : voir Chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*").

2.1.1. Fonctionnalité des sérums anti-peptides produits chez le lapin

Un test de reconnaissance des formes "taguée" et "non taguée" de chaque protéine recombinante a été mené (voir *Figure 44 Partie A*).

Le sérum anti-L4 (Forme courte) reconnaît une protéine de poids moléculaire apparent évalué à 71,7 KDa (*puits L4*) ou à 74,2 KDa pour sa version taguée HISTIDINE (*puits L4T+*).

Le sérum anti-LN10 (forme normale) reconnaît une protéine de poids moléculaire apparent évalué à 75,4 KDa (*puits LN10*) ou à 77,9 KDa pour sa version taguée HISTIDINE (*puits LN10T+*).

Remarque : Les tailles indiquées ici sont déduites des séquences primaires en acides aminés.

2.1.2. Détection des protéines recombinantes à queue poly-Histidine

L'anticorps anti-HIS Tag reconnaît une protéine de poids moléculaire apparent évalué à 74,2 KDa (pour la forme courte L4) et à 77,9 KDa (pour la forme normale LN10). Le signal reste faible pour chacune des bandes correspondantes observées, pour une même quantité de protéines totales déposées (10 µg par puits). **La quantité de protéines taguées produites pour les deux versions apparaît faible.** Une protéine purifiée avec Tag Histidine disponible au laboratoire a été utilisée en tant que Contrôle positif avec l'anticorps de lapin anti-HIS Tag commercial : PGFS1 ("*Prostaglandin F Synthase 1*") (*Puits 3 Figure 44 Partie B*).

2.1.3. Spécificité des immunsérums

Ce test permet de s'assurer que chaque sérum obtenu après immunisation de lapins ne reconnaisse qu'une seule forme de la protéine 12-lipoxygénase. Chaque sérum a été utilisé sur les deux extraits protéiques de cellules COS-7 (L4 et LN10) (voir *Figure 42 Partie C*).

Le sérum anti-peptide L4 reconnaît uniquement l'extrait L4 avec une bande majoritaire apparaît à 71,7 KDa alors qu'aucune bande n'est reconnue dans l'extrait LN10 (*partie gauche de la figure C*). A l'inverse, le sérum anti-peptide LN10 reconnaît uniquement l'extrait LN10 avec une bande unique à 75,4 KDa alors qu'aucune bande n'est reconnue dans l'extrait L4 (*partie droite de la figure C*). Nous sommes donc assurés que les sérums de

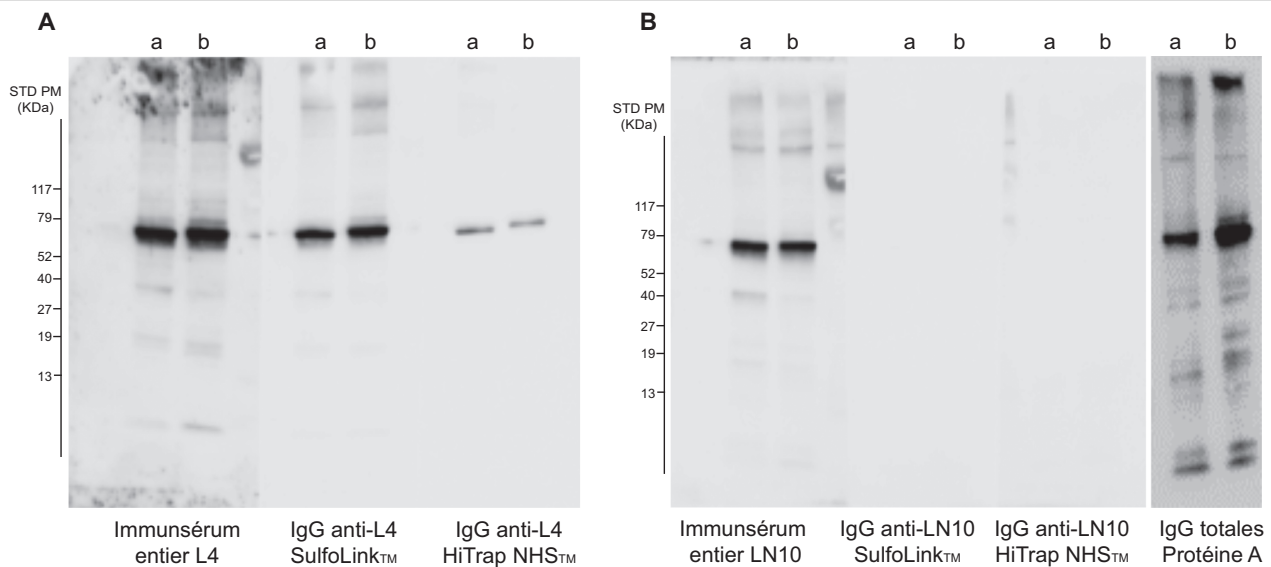


Figure 45 Purification des immunsérums de lapins immunisés par les peptides spécifiques des formes normale LN10 et courte L4 de la protéine 12-lipoxygénase ovine. Analyse des anti-peptides par Western blot.

10µg d'extraits de protéines totales ont été déposés et sont issus respectivement de cellules COS7 transfectées par les plasmides pCMV L4 et pCMV LN10, avec Tag HISTIDINE (puits annoté "a") ou sans Tag HISTIDINE (puits annoté "b"). Chaque type d'IgG purifiée est à la concentration finale de 0,5 µg/ml.

2 types de colonnes de purification ont été utilisés pour obtenir les IgG spécifiques dirigées contre chaque peptide 12LOX (L4 et LN10) :

- HiTrap™ NHS activated HP (capture des IgG via leurs groupements amines primaires),
- Sulfolink® (immobilisation du peptide d'immunisation sur le gel matrice et purification des IgG anti-peptide par affinité)

Un troisième type de colonne a été utilisé pour purifier l'immunsérum de lapin LN10 :

- Protéine A (immobilisation de cette protéine A sur le gel matrice à haute affinité pour le fragment Fc de toutes les immunoglobulines).

Les 2 types de sérum ont été testés non purifiés en "Sérums Contrôles" (Dilution au 1/500^{ème}).

L'immunsérum anti-L4 (Figure A) purifié par système *Sulfolink*® ou *Hitrap*™ NHS est moins efficace en terme de quantité de protéines spécifiques détectées par comparaison au sérum brut d'origine.

L'immunsérum anti-LN10 (Figure B) purifié par système *Sulfolink* ou *Hitrap*™ NHS n'a pas permis la détection de la protéine 12-lipoxygénase correspondante (forme normale) à la concentration utilisée. Quant à sa purification par protéine A, le profil est similaire à celui observé avec le sérum non purifié.

Une différence de taille est observable entre les formes avec/sans Tag HISTIDINE pour chaque cas (puits a versus b), en particulier sur la Figure 44 Partie A avec IgG purifiées par système *Hitrap*™ NHS.

lapins anti-peptides sont bien spécifiques de la forme à laquelle ils sont destinés respectivement.

Il n'y a donc pas de croisement observé du sérum LN10 sur L4 et inversement. Chaque immunosérum de lapin testé est spécifique du peptide utilisé pour l'immunisation.

Suite à ces premiers tests, nous pouvons conclure que :

- **Les cellules COS-7 transfectées produisent les protéines recombinantes attendues,**
- **Les deux sérums anti-peptides entiers produits chez le lapin permettent la détection des protéines recombinantes** dans les extraits de cellules COS-7, protéines dont la taille observée est compatible avec la taille attendue (calculée sur la base de leurs séquences déduites en acides aminés),
- **Les deux anti-peptides sont spécifiques,**
- **Les protéines, codées par les plasmides pCMV prévus pour la production de protéines L4 et LN10 taguées, sont reconnues par l'anticorps anti-HIS Tag.** Ces mêmes protéines sont également révélées par l'utilisation des anti-peptides respectivement.

2.1.4 Tests de purification des IgG des immunosérums de lapins

Les IgG purifiées sur 3 systèmes de chromatographie d'affinité ont été testées par Western blot sur les deux extraits protéiques de cellules COS-7 (L4 et LN10) (voir *Figure 45*).

L'immunosérum anti-L4 (*Partie A*) purifié par système *Sulfolink®* ou *HiTrap™ NHS* est moins efficace en terme de quantité de protéines spécifiques détectées par comparaison au sérum brut d'origine.

L'immunosérum anti-LN10 (*Partie B*), purifié par ces mêmes systèmes, n'a pas permis la détection de la protéine 12-lipoxygénase correspondante (forme normale) à la concentration utilisée. L'absence de détection de protéine spécifique est probablement liée à un problème de configuration du peptide fixé sur les colonnes de purification, problème qui n'est pas rencontré pour les anti-peptides L4. La composition en acides aminés des deux peptides étant différente, l'hypothèse d'une formation de structure tertiaire du peptide LN10 est soulevée. Quant à la purification par *Protéine A* du sérum anti-peptide LN10 (*Partie B, à droite*), le profil est similaire à celui observé avec le sérum brut non purifié. Il n'y a donc pas d'amélioration par cette dernière méthode de purification.

Une différence de taille est observable entre les formes avec/sans Tag HISTIDINE (*puits a et b* respectivement) pour chacun des sérums (bien visible ici sur la *Figure 45 Partie A*, avec les IgG purifiées par système *HiTrap™ NHS*).

Toutes les analyses ultérieures utilisant les sérums de lapins anti-peptides seront faites à partir d'immunosérums bruts. Les purifications testées n'ont pas permis d'obtenir des rendements supérieurs à ceux obtenus avec les sérums non purifiés. La quantité de protéine 12-lipoxygénase détectée par les immunosérums entiers reste supérieure à celle obtenue après les diverses purifications.

C- Recherche de la 12-lipoxygénase dans l'endomètre de brebis : utilisation des anti-peptides

2.1. Tests de fonctionnalité des anti-peptides sur les tissus ovins

Nous avons ensuite recherché la présence de ces protéines dans les tissus "Ex vivo" ovins à l'aide des anti-peptides de lapin caractérisés (voir *Figure 46*).

L'immunosérum de lapin 12LOX LN10 a été testé par Western blot sur 20 µg de protéines totales de deux extraits :

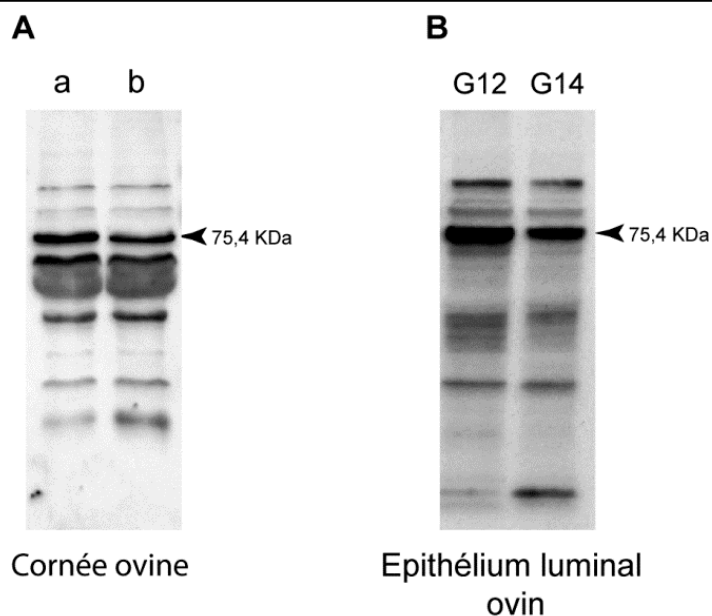


Figure 46 Recherche de la 12-lipoxygénase (Forme normale LN10) dans les tissus ovins. Utilisation de l'immunsérum de lapin anti-peptide LN10. Analyse par Western blot sur des extraits de protéines totales de cornées et d'épithélium luminal utérin (20 µg par puits).

2 cornées issues de 2 brebis différentes ont été utilisées (Figure A, puits a et b).

Les extraits de tissu luminal correspondent à 2 stades de gestation utilisés (Figure B) : 12^{ème} (G12) et 14^{ème} jour (G14).

La forme normale (LN10) de la 12-lipoxygénase est détectée par l'immunsérum anti-peptide LN10 à la taille attendue (75,4 KDa) dans les cornées et les extraits de tissu luminal ovins. La quantité détectée au 12^{ème} jour de gestation est supérieure à celle du 14^{ème} jour (puits G12 et G14 respectivement). Un contrôle de charge (avec un anticorps anti-β Actine) a été effectué (non montré ici).

L'immunsérum anti-peptide LN10 reconnaît la forme normale native de la 12-lipoxygénase dans les tissus ovins testés.

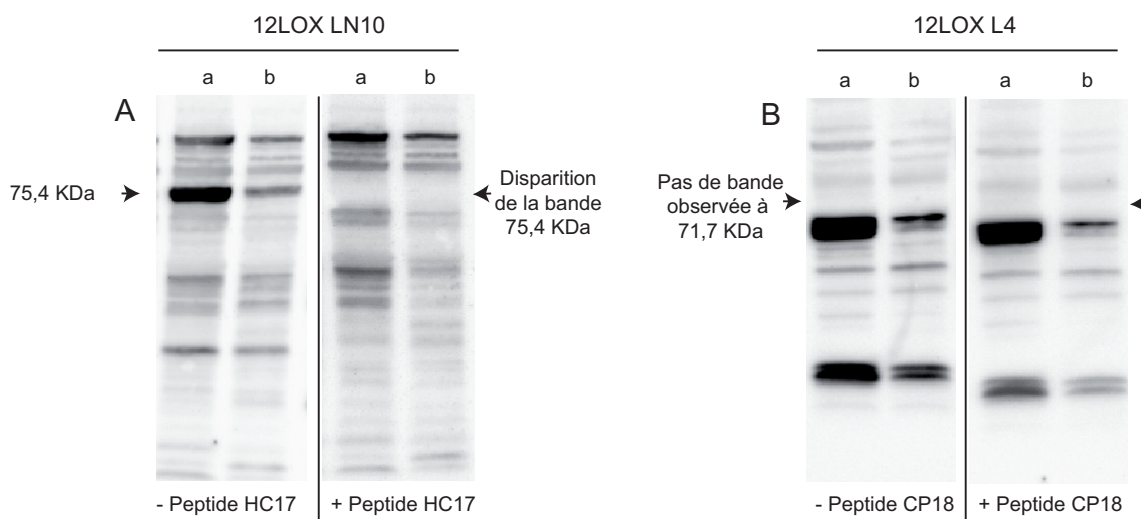


Figure 47 Tests d'immunoneutralisation des sérums de lapins par les peptides

Les extraits de tissu luminal correspondent à 2 stades de gestation : 12^{ème} (puits a) et 14^{ème} jour (puits b). Les tailles indiquées sont déduites des séquences primaires en acides aminés.

- de deux cornées ovines indépendantes (voir *Partie A, puits a et b*), la cornée étant un tissu de référence décrit chez l'espèce bovine pour la détection de la protéine 12-lipoxygénase de type plaquettaire,
- d'épithélium luminal d'utérus de brebis en gestation (voir *Partie B*) à 12 jours (*puits G12*) et 14 jours (*puits G14*).

Le sérum anti-peptide LN10 reconnaît une protéine à la taille attendue sur l'ensemble des extraits protéiques testés : une bande de forte intensité de 75,4 KDa. Des bandes surnuméraires, probablement non spécifiques, sont visibles ici, l'anti-peptide LN10 n'ayant pas été préalablement séroneutralisé par un Sérum Normal de Brebis (ou SNB). La bande de 75,4 KDa est reconnue par l'immunsérum dans les cornées ovines testées.

L'immunsérum anti-peptide 12 LOX LN10 reconnaît la forme normale native de la 12-lipoxygénase dans les tissus ovins testés.

Une immunoneutralisation préalable de l'immunsérum 12LOX LN10 par son peptide (HC17) (voir *Figure 47 Partie A*) entraîne une disparition de la bande de 75,4 KDa.

Des tests similaires ont été effectués dans les mêmes conditions que précédemment avec l'anti-peptide L4 (voir *Figure 47 Partie B*).

Aucune bande n'est observée avec l'immunsérum 12LOX L4 aux deux stades de gestation (12 jours puits a, 14 jours puits b), à la taille attendue de 71,7 KDa et l'addition du peptide correspondant ne modifie pas le profil du blot.

Qu'en est-il de la forme courte L4? Peut-on être sûr de détecter la bonne protéine dans des extraits aussi complexes issus de tissus?

Cette étude a été reproduite en utilisant les extraits protéiques des cellules COS-7 comme "Contrôles" (voir *Figure 48*) afin de s'assurer :

- que la protéine de 75,4 KDa, détectée avec l'anti-LN10 en tissu luminal correspond à la même protéine détectable en cellules COS-7 transfectées,
- que l'anti-peptide L4 permet de détecter la protéine correspondante dans les cellules COS-7 transfectées. Si tel est le cas, l'absence de détection dans le tissu luminal (observé à la *Figure 48 Partie B*) nous permettrait de conclure que la protéine est indétectable dans l'endomètre ovin.

Ainsi, le **sérum anti-peptide L4** testé sur les extraits de luminal ovin à 12 et 14 jours de gestation **ne permet pas de mettre en évidence la protéine 12-lipoxygénase forme courte L4 à la taille attendue de 71,7 KDa** contrairement aux cellules COS-7 qui surexpriment cette forme (voir *Figure 48 puits c Partie A*).

Une immunoneutralisation de ce sérum par le peptide L4 (voir *Figure 48 Partie B*) permet une disparition complète de la bande de 71,7 KDa et des 3 à 4 bandes sous-jacentes dans l'extrait de COS-7 qui surexpriment cette forme (voir *Figure 48 Partie A puits c*). Ces dernières bandes indiquent probablement la présence de protéines 12-lipoxygénase L4 soient incomplètement traduites, soient clivées ou dégradées.

Le sérum anti-peptide L4 confirme sa capacité à détecter la forme courte L4 de la 12-lipoxygénase dans les COS-7 transfectées correspondantes. Ce sérum est en revanche incapable de détecter la protéine souhaitée dans les cellules lumineales ovines.

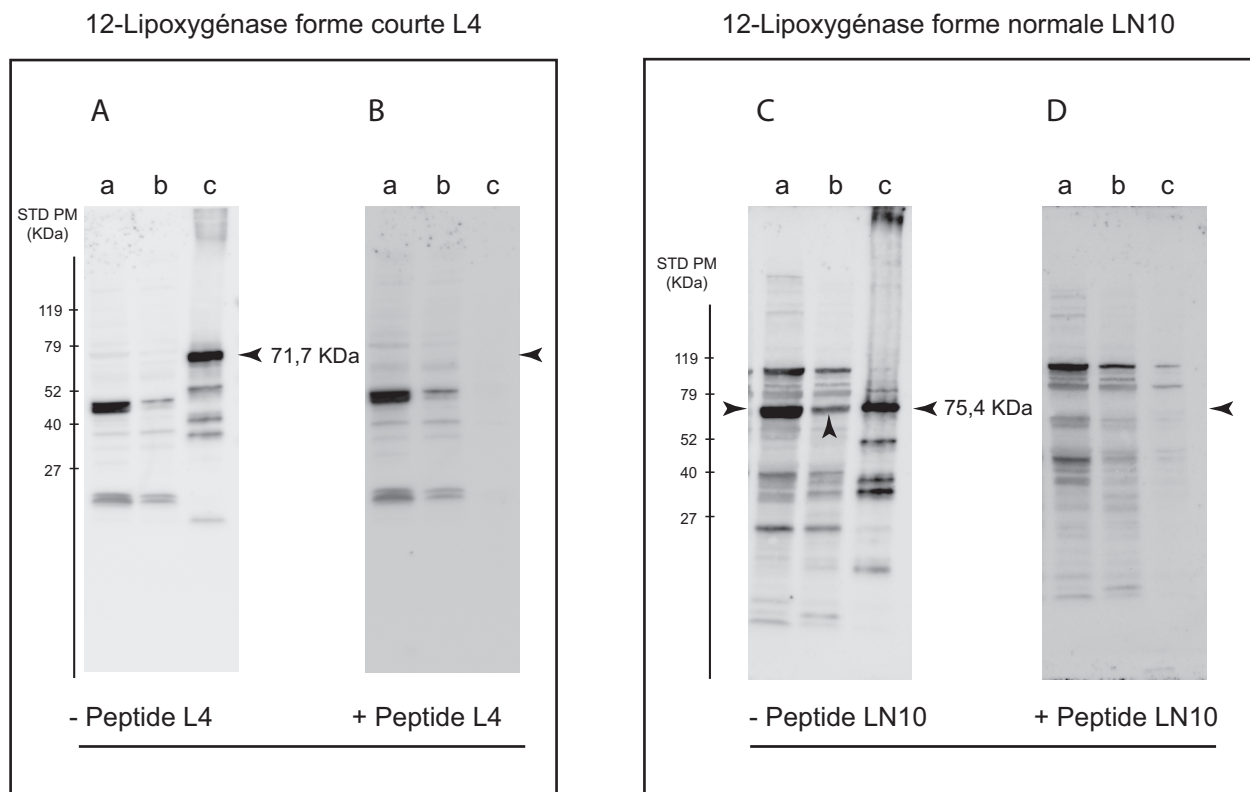


Figure 48 Recherche des 2 formes de la 12-lipoxygénase (courte L4 et normale LN10) dans l'épithélium luminal ovin à l'aide des immunosérums de lapins. Test d'immunoneutralisation des 2 sérums par les peptides correspondant à ces 2 formes. Analyse par Western blot d'extraits totaux de protéines de tissu luminal (20µg par puits) et de cellules COS-7 transfectées (10 µg par puits). Les deux parties de figure sont indépendantes (L4 à gauche, LN10 à droite).

Les extraits de tissu luminal correspondent à 2 stades de gestation (*puits a et b* de chaque figure) : 12^{ème} et 14^{ème} jour respectivement.

Les cellules COS-7 transfectées sont utilisées en contrôles internes (*puits c* de chaque figure) et correspondent respectivement à la forme recherchée de 12-lipoxygénase recombinante (L4 pour les *Parties A et B*, LN10 pour les *Parties C et D*).

Partie A : La forme courte L4 n'est pas détectable par l'immunosérum anti-peptide L4 à la taille attendue (71,7 KDa) dans les extraits de tissu luminal. En revanche, l'extrait de cellules COS-7 transfectée L4 présente une bande à la taille attendue de 71,7 KDa.

Partie C : La forme normale (LN10) de la 12-lipoxygénase est détectée par l'immunosérum anti-peptide LN10 à la taille attendue (75,4 KDa) dans les 2 extraits de tissu luminal. La quantité détectée au 12^{ème} jour de gestation est supérieure à celle du 14^{ème} jour (*puits a et b* respectivement). L'extrait de cellules COS-7 transfectée LN10 présente une bande à la taille attendue (75,4 KDa).

L'immunoneutralisation de l'immunosérum anti-LN10 par le peptide LN10 (*Partie D*), préalable à l'incubation des membranes avec cet anti-peptide montre une disparition complète de la bande 75,4 KDa pour LN10. L'immunosérum anti-LN10 est donc spécifique de cette forme normale de 12-lipoxygénase.

La même opération effectuée avec l'immunosérum anti-L4 et le peptide correspondant ne change pas le profil du blot concernant les extraits de tissu luminal (*Partie B*). En revanche, la bande observée sur les cellules COS-7 L4 disparaît dans ces conditions. L'immunosérum anti-L4 est donc spécifique de cette forme courte de 12-lipoxygénase mais ne permet pas la détection de cette forme dans les cellules luminales.

Le sérum anti-peptide LN10 testé sur les extraits de luminal ovin à 12 et 14 jours de gestation permet de mettre en évidence la protéine 12-lipoxygénase de forme normale LN10 à la taille attendue de 75,4 KDa de façon identique par l'extrait de cellules COS-7 qui surexpriment cette forme (voir *Figure 48 puits c Partie C*).

Une **immunoneutralisation de ce sérum par le peptide LN10** (voir *Figure 48 Partie D*) permet une **disparition complète de la bande de 75,4 KDa** et des 3 à 4 bandes sous-jacentes. Ces dernières indiquent là aussi probablement la présence de protéines 12-lipoxygénase LN10 soient incomplètement traduites, soient clivées ou dégradées.

Le sérum anti-peptide LN10 confirme sa capacité à détecter la forme normale LN10 de la 12-lipoxygénase dans les COS-7 transfectées correspondantes et les extraits de cellules lumineales ovines.

Remarque : Les anti-peptides anti-12LOX L4 et anti-12LOX LN10 permettent également de révéler des bandes aspécifiques puisque les sérums utilisés ici ne sont pas purifiés.

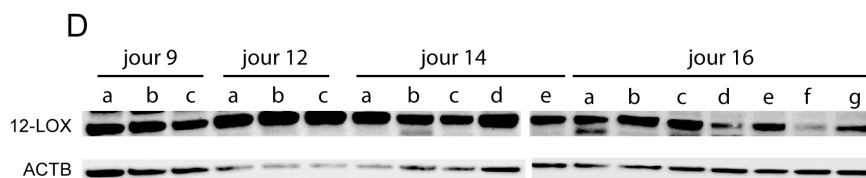
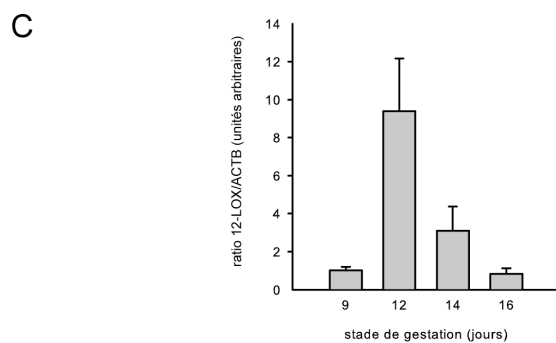
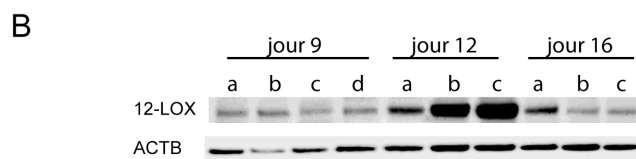
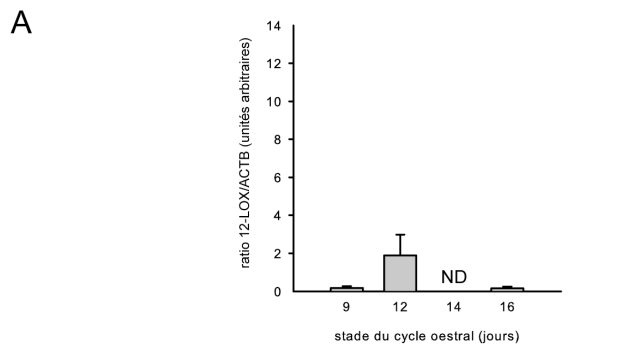


Figure 49 Expression de la protéine 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules luminales de l'endomètre ovin. Analyse par western blot sur des extraits de protéines totales d'épithélium luminal utérin à différents stades du cycle œstral et en début de gestation (20 µg par puits).

Utilisation de l'immunsérum de lapin anti-peptide LN10 (12-LOX). 3 à 7 animaux (brebis a à g) ont été utilisés par stade (*Partie B* pour le cycle, *Partie D* pour la gestation, parties hautes).

Un anticorps monoclonal de souris anti-ACTINE β (ACTB) a été utilisé sur les mêmes membranes (*Partie B* pour le cycle, *Partie D* pour la gestation, parties basses).

La taille calculée de la protéine normale de la 12-lipoxygénase est de 75,4 KDa (663 aa), celle de l'Actine β est de 41,2 KDa (375 aa).

Les parties A et C représentent les quantifications de l'expression de la 12LOX faite pour chaque échantillon en cycle et en gestation. Des représentations graphiques du ratio 12-LOX / ACTB en fonction du stade (jours) sont données respectivement pour ces périodes physiologiques.

La 12-lipoxygénase est présente pendant toute la durée du cycle œstral étudiée et son taux est maximal au 12^{ème} jour.

En début de gestation, pendant la période péri-implantatoire de l'embryon, la quantité de 12-lipoxygénase suit le même type d'évolution que durant le cycle mais de façon accrue. Son taux est maximal au 12^{ème} jour de gestation.

2.2. Expression de la 12-lipoxygénase au cours du cycle œstral et en début de gestation dans l'endomètre de brebis

Nous disposons d'immunsérums entiers de lapins dirigés contre les peptides spécifiques de chacun des formes de 12-lipoxygénase identifiées (forme courte L4, forme normale LN10). Nous avons caractérisé ces anti-peptides et les conditions d'utilisation par la technique de Western blot ont été préalablement établies.

Les profils d'expression des transcrits ont été établis dans l'épithélium luminal par Northern blot lors du cycle œstral et en début de gestation chez la brebis (voir *Chapitre "A/ Introduction", III- 1. Contexte et résultats préliminaires*).

Qu'en est-il du niveau d'expression de la protéine 12-lipoxygénase de forme longue LN10 ?

L'anti-peptide LN10 (forme normale de la 12-lipoxygénase ovine) a été utilisé sur des extraits de cellules lumineuses ovines au cours du cycle œstral (3 stades : jours 9, 12 et 16) et pendant la période péri-implantatoire de l'embryon chez la brebis (4 stades : jours 9, 12, 14 et 16). Le profil d'expression protéique a été établi par une technique de Western blot (voir *Figure 49*). Une standardisation des niveaux d'expression protéique de la 12-lipoxygénase ovine (forme normale) a été faite par l'Actine β . Une analyse de variance a été menée.

Il existe une différence d'expression de la 12-lipoxygénase forme normale (LN10) entre le cycle œstral et la période du début de gestation étudiée. Cette différence entre statuts (cycle et gestation) est significative ($p < 0,0348$). Nous observons également une expression de la 12-lipoxygénase significativement différente selon les stades ($p < 0,0087$).

Au cours du cycle œstral, entre les 9^{ème} et 16^{ème} jours, le niveau de la 12-lipoxygénase (forme normale) présente un pic d'expression au 12^{ème} jour.

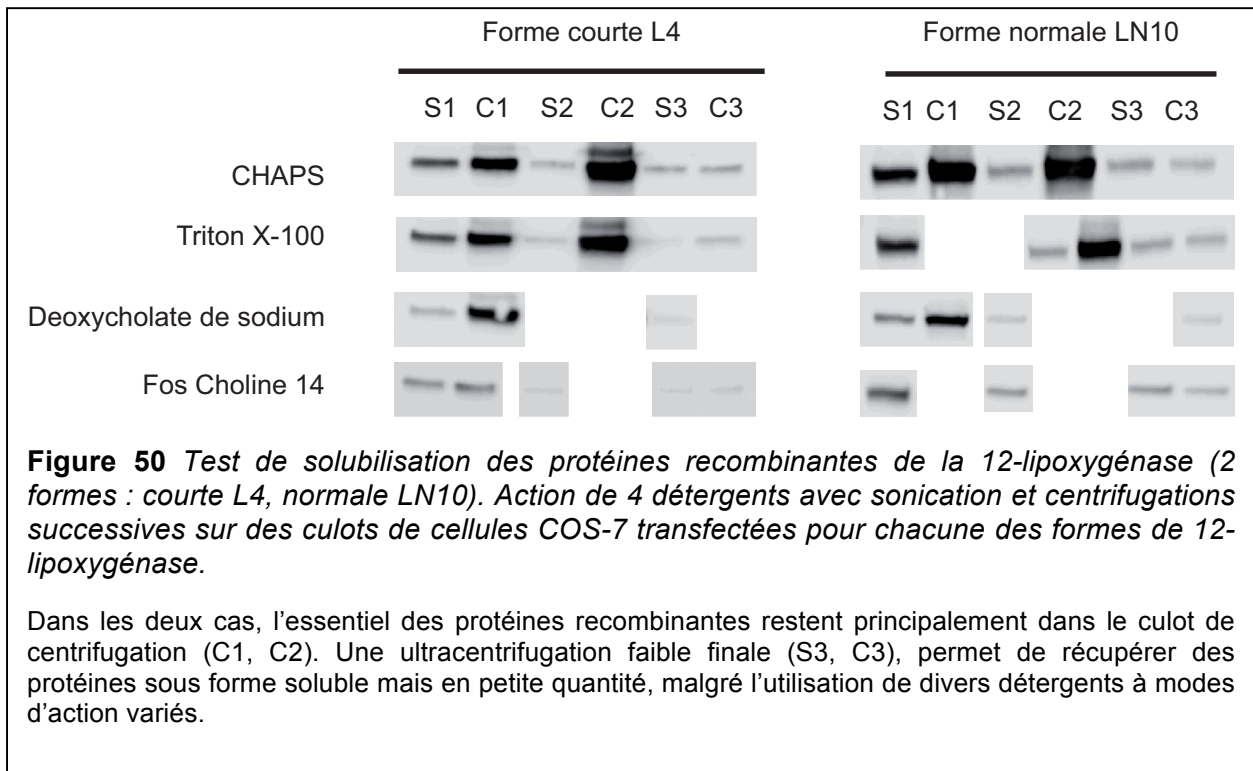
Pour rappel : Le transcrit de la 12-lipoxygénase ovine est présent entre 7 et 14 jours du cycle œstral chez la brebis, avec une expression forte en phase lutéale entre 9 et 12 jours.

La protéine suit donc le niveau d'expression du transcrit correspondant.

En début de gestation, cette expression est observée entre 9 et 16 jours, avec un maximum atteint au 12^{ème} jour. **Le niveau d'expression de la protéine est néanmoins plus important pendant cette période que pendant le cycle œstral. Le pic d'expression de la protéine se situe au 12ème jour de gestation. Les mêmes observations sont faites concernant le profil d'expression du transcrit.** Cette période correspond à l'apposition de l'embryon contre la paroi utérine en début d'implantation.

Le profil d'expression du transcrit et le taux de la protéine 12-lipoxygénase dans l'utérus de brebis suivent donc les mêmes évolutions sur les périodes physiologiques étudiées.

Remarque : Compte tenu de l'absence de signal avec l'anti-peptide L4 (forme courte de la 12-lipoxygénase) observée lors des premiers tests, dans les conditions de Western blot utilisées, **aucune cinétique d'expression de cette forme courte n'a pu être effectuée** sur les extraits de protéines totales choisis.



IV- Activité enzymatique des protéines recombinantes produites en système eucaryote

A- Solubilisation - Purification des protéines recombinantes des deux formes de 12LOX

1. Obtention de protéines recombinantes en phase soluble avant purification

Les protéines totales de cellules COS-7 transfectées, extraites par sonication en solution tampon, en présence de différents détergents, suivie de centrifugations successives (voir Chapitre "*B/ Matériels et Méthodes*"). Chacune des fractions protéiques obtenues est analysée par Western blot (dépôts de 20 µg de protéines totales/puits) (voir *Figure 50*). Les anti-peptides entiers correspondants sont utilisés. Certaines fractions ne peuvent être analysées puisque trop peu concentrées en protéines.

En utilisant le CHAPS, pour l'ensemble des fractions obtenues, la majorité des protéines, détectables par les anti-peptides (L4, LN10), se trouvent essentiellement dans les culots de centrifugation (C1 à C2). Les fractions de "Surnageants" sont moins concentrées que les fractions "Culots". Les fractions issues d'une ultracentrifugation faible (S3, C3) présentent des taux faibles en protéine 12-LOX.

Les mêmes observations sont valables avec le Triton X-100.

L'ultracentrifugation (Surnageant S3, culot C3) ne permet pas de récupérer plus de protéines recombinantes 12-lipoxygénase que lors des premières centrifugations. L'essentiel des protéines surexprimées est collecté dans les premières fractions (issues donc des centrifugations 1 et 2). Ces premières fractions permettent de collecter les protéines essentiellement sous forme insoluble (noyaux, membranes cellulaires...).

Le CHAPS et le Triton X-100 restent néanmoins les détergents offrant le meilleur rendement d'extraction de protéines recombinantes. Le déoxycholate de sodium et la Fos Choline 14 ne permettent pas l'obtention de protéines solubles en plus grande quantité. Les rendements sont d'ailleurs plus faibles avec ces deux derniers.

Les protéines recombinantes détectées se trouvent donc sous forme majoritairement insoluble et l'utilisation des divers détergents testés n'a pas permis d'augmenter le rendement de protéines sous forme soluble. Nous continuerons d'utiliser le CHAPS.

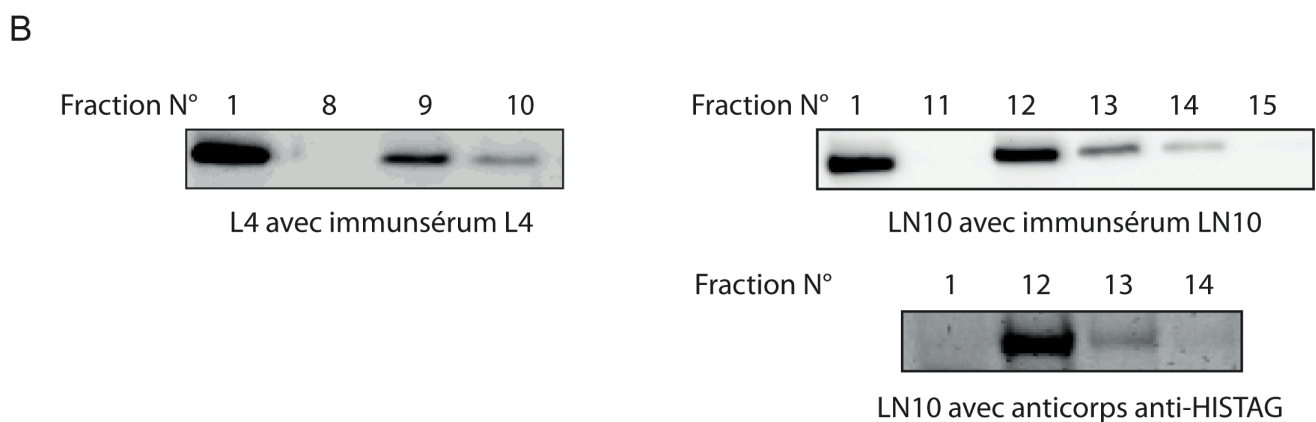
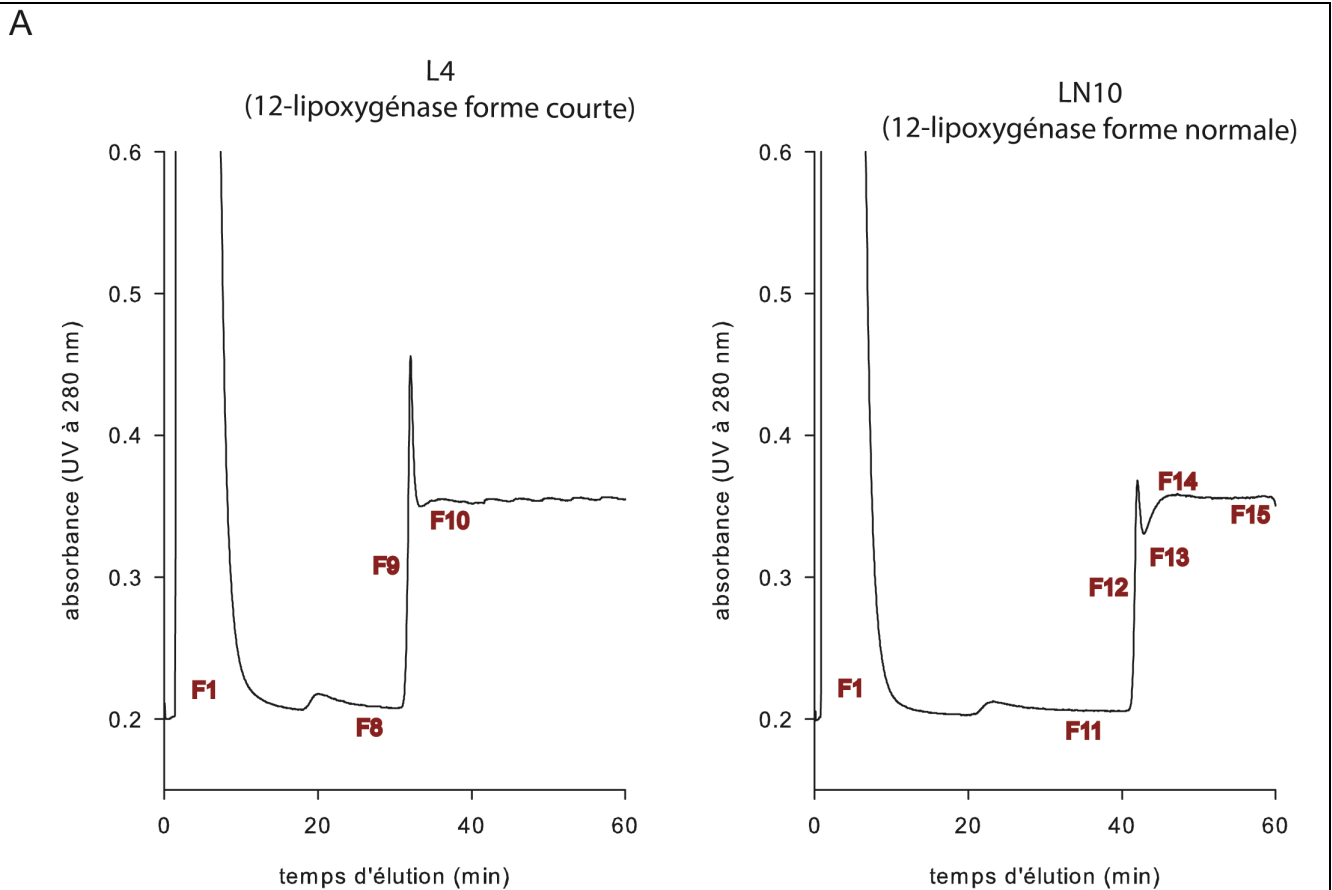
2. Purification des protéines recombinantes à queue Poly-Histidine sur colonnes *Pierce® HisPur™*

La purification d'extraits de cellules COS-7 transfectées respectivement avec les plasmides 12 LOX L4 et LN10 se fait à l'aide de colonnes de chromatographie d'affinité *Pierce® HisPur™* (*ThermoFisher*) dont la matrice comporte des groupements d'ions cobalt Co^{2+} à forte affinité avec l'Histidine des Tags protéiques).

Les différentes fractions de 2 ml sont détectées en UV et isolées grâce à un collecteur de fractions (voir *Figures 51 Partie A* correspondant à la forme courte L4 à gauche, et à la forme normale LN10 à droite).

La purification des protéines recombinantes 12-lipoxygénase sous ses deux formes taguées se traduit par des profils similaires :

- Un premier pic dit "Fraction 1 ou F1" est visible suite à l'injection dans l'analyseur. **Ce pic correspond à l'ensemble des protéines cellulaires non retenues sur la matrice cobalt de la colonne de purification.** Le volume de cette fraction avoisine les 10 ml et contient une



(Analyses HPLC de G. Charpigny - UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France)

Figure 51 Purification des protéines recombinantes 12-lipoxygénase avec tag Histidine. Analyse des diverses fractions collectées par Chromatographie d'affinité sur colonne HisPur™ Cobalt Co²⁺.

Les cellules COS-7 transfectées 24h avec chaque plasmide pCMV-12LOX respectivement sont extraites en tampon 50mM Phosphate avec 300 mM NaCl et 32 mM CHAPS pH 7,4 (broyage, sonication). Le surnageant de centrifugation est ensuite dilué dans le même tampon puis injecté dans l'analyseur. Un passage du tampon additionné de 150mM d'imidazole permet l'éluion des protéines 12-LOX taguées Histidine (rupture de la liaison entre le groupement 10X Histidine/ions Cobalt de la matrice) Les différentes fractions sont détectées en UV et isolées via un collecteur de fractions (Graphiques A). L'évaluation de chaque fraction est faite par Western blot (Western blots B).

Pour les deux types de recombinants (L4 et LN10), la majorité des protéines est passée dans le front (Fraction 1). L'essentiel des protéines éluées par l'imidazole se retrouve dans la fraction 9 (pour L4) et 12 (pour LN10). Cette dernière est confirmée par le western blot effectué avec l'anticorps anti-HIS Tag.

Les fractions suivantes contiennent encore des protéines en quantité plus faible (pour L4 et LN10).

quantité importante de protéines (par comparaison aux fractions suivantes), dont notre protéine d'intérêt.

- Cette "Fraction F1" est suivie d'un "plateau" (Fraction F8 pour L4, F11 pour LN10).
- Les protéines taguées, fixées sur la colonne sont ensuite éluées. Le pic correspondant est visible sous la dénomination F9 pour L4 et F12 pour LN10.
- Un plateau final suit la fraction éluee pour chaque purification (F10 pour L4, F13 à F15 pour LN10).

L'évaluation de chaque fraction collectée est faite par Western blot (voir *Figure 51 Partie B*) en utilisant les immunosérums bruts de lapins 12LOX L4 et 12LOX LN10 respectivement. Seules les fractions indiquées en rouge sur chaque graphique de la *Figure 49 Partie A* sont analysées par Western blot (10µl de fraction par puits).

Ainsi, pour la forme courte L4 de la 12-lipoxygénase, une **majorité de cette forme est détectée dans la Fraction F1** (*Figure 49 Partie B, à gauche*). La fraction d'élution F9 en comprend mais 10 fois moins. La fraction suivante F10 montre la présence de la protéine 12LOX L4 mais plus faiblement. Ces observations nous indiquent que **les protéines recombinantes 12-lipoxygénase de forme courte ne sont pas retenues totalement sur la colonne Agarose/Cobalt Co²⁺**. Une grosse partie d'entre elles passe à travers la colonne sans rétention.

Aucune protéine recombinante de forme courte n'est détectée dans la fraction de lavage, attestant de l'absence de toute protéine taguée résiduelle de la matrice.

Seule la fraction F9 contient la protéine taguée HIS 12-lipoxygénase forme courte L4 sous forme purifiée.

Quant à la forme normale LN10 de la 12-lipoxygénase, une **majorité de cette forme est détectée dans le Front F1** (*Figure 49 Partie B, à droite*). La fraction d'élution F12 en comprend dans les mêmes proportions. Les fractions suivantes F13, F14 montrent la présence de la protéine 12LOX LN10 mais plus faiblement. Le **décrochage de la matrice des protéines taguées se fait progressivement en tampon d'élution**. La dernière fraction testée (F15) ne montre plus de trace de protéine recombinante LN10 détectable avec l'immunosérum, confirmant alors que toutes les protéines taguées sont totalement détachées de la matrice.

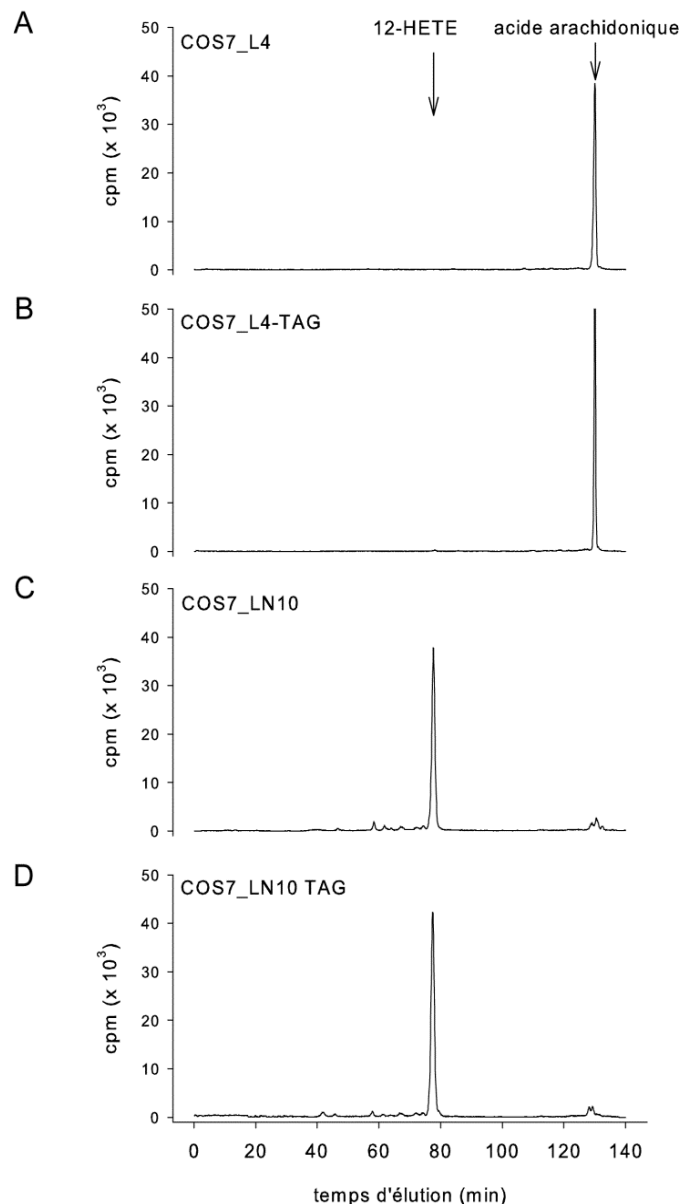
Ces observations nous indiquent que les protéines recombinantes 12-lipoxygénase de forme normale ne sont pas retenues totalement sur la colonne Agarose/Cobalt. Une partie d'entre elles passe à travers la colonne sans rétention.

Seule la fraction F12 contient la protéine taguée HIS 12-lipoxygénase forme normale LN10 sous forme purifiée.

Une deuxième analyse par Western blot est menée sur les fractions de purification de la forme normale de la 12-lipoxygénase recombinante avec un anticorps anti-HIS Tag. La fraction F1, qui contient des protéines 12-lipoxygénase de forme normale LN10 détectée avec l'immunosérum anti-peptide LN10, ne révèle pas de présence de cette même protéine en version taguée poly-HISTIDINE avec l'anticorps anti-HIS Tag. Cela signifie que **les protéines 12 LOX LN10 détectées dans le Front F1 ne sont pas taguées.**

Pour les fractions F12, F13 et F14, l'essentiel des protéines taguées détectées avec l'anti-HIS Tag se trouve dans la fraction F12 et en moindre quantité dans les deux autres.

Pour conclure, ce dernier test nous permet d'affirmer qu'**une majorité de protéines recombinantes 12LOX LN10 se trouve essentiellement sous forme non taguée**. Ces protéines ne sont donc pas retenues sur la colonne de purification, ce qui explique leur **présence en grande quantité dans la fraction F1. Une faible quantité de protéines 12LOX LN10 possède un Tag HIS.**



(Analyses HPLC de G. Charpigny - UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France)

Figure 52 Evaluation de l'activité enzymatique des protéines 12-lipoxygénases recombinantes (Formes courte L4 et normale LN10, avec/sans Tag Histidine). Mesure du métabolite 12-HETE par Chromatographie HPLC avec détection radioactive sur des extraits de protéines totales de cellules COS-7 transfectées.

L'activité de conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE par les protéines recombinantes des formes courte et normale de la 12-lipoxygénase est évaluée sur des extraits de protéines totales de COS-7 transfectées, après incubation en présence d'acide arachidonique radiomarqué (^3H). La réaction est arrêtée avec de l'acide citrique et le métabolite 12-HETE radioactif est extrait du mélange par les solvants (Acétate d'Ethyl / Cyclohexane), puis évalué quantitativement par HPLC. L'évaluation de la production de 12-HETE est faite sur des cellules COS-7 transfectées par les plasmides L4, L4 avec Tag HIS, LN10 et LN10 avec Tag HIS.

La forme courte de la 12-lipoxygénase (avec/sans Tag, Chromatogrammes Profils A & B) ne convertit pas l'acide arachidonique en métabolite 12-HETE : cette forme courte est donc inactive. L'acide arachidonique est donc retrouvé en fin de chromatogramme au temps 130 minutes.

La forme normale LN10 produit du 12-HETE détectable au bout de 78 minutes, ce en présence ou en absence du Tag Histidine (Chromatogrammes Profils C & D). La protéine recombinante LN10 présente donc une activité de conversion de l'A.A. en 12-HETE, activité qui n'est pas gênée par la présence du Tag.

Ainsi, l'extraction de protéines totales des cellules COS-7 transfectées par le plasmide pCMV LN10 + TAG3 permet de conclure que **la construction ne permet pas d'optimiser en l'état la production de protéines taguées**, l'essentiel de la production se trouvant non associé à un Tag.

B- Activité biologique des protéines recombinantes des deux formes de 12LOX

1. Mesure d'activité de conversion de l'A.A. en 12-S-HETE sur extraits de protéines totales de COS-7

Grâce aux analyses précédentes, nous avons pu constater que les cellules COS-7 transfectées avec les plasmides pCMV 12LOX correspondant à chacune des deux formes ont la capacité de produire les protéines recombinantes souhaitées.

Ces protéines surexprimées sont-elles biologiquement actives?

Un test *in vitro* nous permet d'en évaluer la capacité (voir *Partie "B/ Matériels et Méthodes"*) : l'activité de conversion de l'acide arachidonique radiomarqué au tritium en métabolite 12-HETE tritié par les protéines recombinantes produites par des COS-7 transfectées.

Cette activité de conversion se traduit sur chromatogramme par la production du métabolite 12-HETE dont le pic est détectable au temps d'éluion t = 80 minutes. L'acide arachidonique résiduel présente un pic visible à partir du temps d'éluion t = 130 minutes.

Quatre extraits de protéines totales de cellules COS-7 sont analysés (voir Figure 52) : COS-7 L4 sans TAG (Profil A), COS-7 L4 avec TAG (Profil B), COS-7 LN10 sans TAG (Profil C), COS-7 LN10 avec TAG (Profil D).

Les extraits de cellules COS-7 transfectées avec les constructions pCMV 12LOX forme courte L4 +/- TAG ne présente aucun pic de 12-HETE détectable au temps d'éluion t = 80 minutes (*Profils A et B* respectivement). L'acide arachidonique tritié libre, présent en début de test, est retrouvé en totalité en fin d'analyse au temps d'éluion t = 130 minutes.

La forme L4 de la 12-lipoxygénase ne montre aucune activité de conversion (en présence ou absence d'un Tag HISTIDINE) : les deux protéines 12-lipoxygénase de forme courte L4 produites sont donc inactives.

Les extraits de cellules COS-7 transfectées avec les constructions pCMV 12LOX forme normale LN10 +/- TAG présente un pic de 12-HETE détectable au temps 80 minutes (*Profils C et D* respectivement). L'acide arachidonique tritié libre présent en début de test est retrouvé en quantité très faible en fin d'analyse au temps d'éluion t = 130 minutes, confirmant ainsi son utilisation pour la fabrication du métabolite.

La forme LN10 de la 12-lipoxygénase montre une activité de conversion en présence comme en l'absence d'un Tag HISTIDINE : les deux protéines 12-lipoxygénase de forme normale LN10 produites sont donc toutes deux actives, le Tag HISTIDINE n'entravant pas l'activité de conversion.

2. Test de compétition des deux formes de protéines vis-à-vis du substrat

Nous avons constaté précédemment que la protéine 12LOX L4 n'est pas détectable selon nos conditions expérimentales dans l'endomètre ovin, malgré la présence du transcrite correspondant.

Mais si l'existence de cette protéine 12-lipoxygénase de forme courte (L4) est avérée dans l'utérus de brebis, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette dernière puisse jouer un rôle dans le processus de conversion de l'acide arachidonique en présence de la forme normale de la 12-lipoxygénase.

La forme courte 12LOX L4 pourrait inhiber l'activité de la forme longue 12LOX LN10. Nous avons testé cette hypothèse avec les cellules COS-7 transfectées, en réalisant des tests de

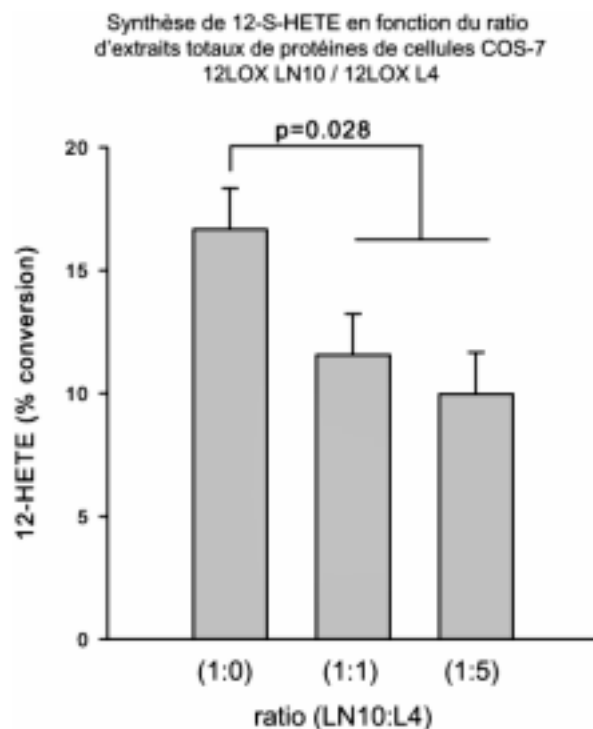


Figure 53 Test de compétition vis-à-vis du substrat des 2 protéines recombinantes 12-lipoxygénases produites en cellules COS-7 transfectées (forme courte L4 et forme normale LN10). Test sur extraits de protéines totales.

Mesure de l'activité de conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE par chromatographie (HPLC).

Chacun des extraits de protéines totales de cellules COS-7 transfectées est mis en incubation dans diverses proportions (LN10 seule 1:0, mêmes volumes d'extraits LN10 et L4 1 :1, 5 fois plus d'extrait L4 que de LN10 1 :5).

Ce test permet de constater que la forme courte L4 de la 12-lipoxygénase recombinante diminue l'activité de conversion de la forme normale LN10 de l'enzyme.

compétition entre les deux protéines recombinantes vis-à-vis du substrat, sur extraits totaux de cellules puis avec les protéines purifiées.

Pour ce test de compétition, nous faisons varier les quantités de protéines 12LOX L4 (extrait de cellules ou protéines recombinantes purifiées) tout en gardant constante la quantité de protéines 12LOX LN10 (extrait de cellules ou protéines recombinantes purifiées).

2.1. Sur extraits de protéines totales de cellules COS-7

Chacun des extraits de protéines totales de cellules COS-7 transfectées est mis en incubation dans diverses proportions (LN10 seule 1:0, mêmes volumes d'extraits LN10 et L4 1 :1, 5 fois plus d'extrait L4 que de LN10 1 :5). La charge protéique globale dans chacun des tubes est assurée par l'addition d'extrait de protéines totales de cellules COS-7 non transfectées afin d'assurer un volume constant réactionnel dans chacun des tubes.

Le graphique de la *Figure 53* indique le pourcentage de conversion (production de métabolite 12-HETE) en fonction des ratios d'extraits LN10:L4. Un extrait de cellules COS-7 transfectées par pCMV 12LOX LN10+TAG3 seul (ratio 1:0) permet la conversion de 17% d'acide arachidonique en 12-HETE.

Lorsque nous ajoutons à cet extrait la même quantité d'extrait de cellules COS-7 transfectées par pCMV 12LOX L4+TAG (ratio 1:1), la conversion diminue de 5 points (activité de 12%). De la même manière, lorsque nous ajoutons, à cet extrait, cinq fois plus d'extrait de protéines totales de cellules COS-7 transfectées par pCMV 12LOX L4+TAG (ratio 1:5), la conversion diminue de 7 points (activité de 10%).

Nous démontrons ainsi que la protéine 12-lipoxygénase sous sa forme courte (L4) diminue l'activité de conversion d'A.A. en 12-HETE que possède la protéine 12-lipoxygénase de forme normale LN10.

La forme courte L4 de la 12LOX semble donc avoir un rôle régulateur sur l'activité enzymatique de la forme normale LN10 de cette enzyme dans les extraits totaux de protéines issues de cellules COS-7 transfectées. Qu'en est-il sur protéines purifiées?

2.2. Sur protéines taguées Histidine, purifiées

Un test de conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE a été réalisé à partir de des protéines recombinantes purifiées (voir *Figure 54*)

Nous procédons ici de la même manière que pour la mesure d'activité faite au point précédent sur extraits cellulaires entiers de COS-7. Les tubes ne sont pas préparés ici en triplicate.

Nous faisons varier les quantités de protéines purifiées 12LOX LN10 et L4 taguées. La quantité de protéines purifiées 12LOX LN10 reste invariable.

Ainsi, chacune des protéines est mise en incubation dans diverses proportions (LN10 seule 1:0, mêmes volumes de protéine LN10 et L4 1 :1, 5 fois plus d'extrait L4 que de LN10 1 :5, enfin L4 seule).

La *Figure 53* indique le pourcentage de conversion (production de métabolite 12-HETE) en fonction des ratios d'extraits LN10:L4. Un extrait protéique purifié 12LOX LN10 seul (ratio 1:0) permet la conversion de 3,8% d'acide arachidonique en 12-HETE. A l'inverse, aucune conversion n'est observée lorsque l'extrait protéique purifié 12LOX L4 est seul.

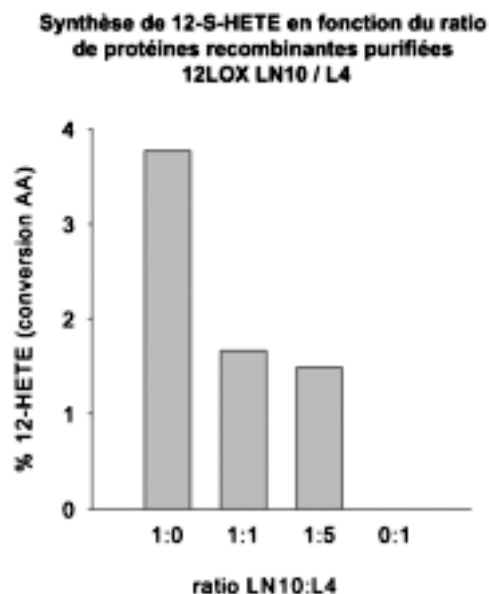


Figure 54 Test de compétition vis-à-vis du substrat des 2 protéines recombinantes 12-lipoxygénases à queue poly-Histidine, purifiées par affinité (Cobalt Co^{2+}) et produites en cellules COS-7 transfectées (forme courte L4 et forme normale LN10).

Mesure de l'activité de conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE par chromatographie (HPLC).

Chacune des protéines purifiées est mise en incubation dans diverses proportions (LN10 seule 1:0, mêmes volumes de protéines purifiées LN10 et L4 1:1, 5 fois plus de protéine L4 que de LN10 1:5 ou encore L4 seule 0:1).

Ce test permet de constater qu'après la purification sur colonne d'affinité Cobalt, en présence de tampon Phosphate avec Imidazole, l'activité enzymatique de LN10 n'est pas perdue. De plus, la forme courte L4 de la 12-lipoxygénase recombinante joue toujours un rôle sur l'activité de conversion de la forme normale LN10 de l'enzyme en diminuant cette dernière.

Lorsque nous ajoutons, à la protéine purifiée 12LOX LN10, la même quantité de protéine purifiée 12LOX L4 (ratio 1:1), la conversion diminue de 2,1 points (activité de 1,8%). De la même manière, lorsque nous ajoutons, à cet extrait 12LOX LN10, cinq fois plus d'extrait purifié 12LOX L4 (ratio 1:5), la conversion diminue 2,5 points (activité de 1,5%).

Nous démontrons ainsi que la protéine 12-lipoxygénase sous sa forme courte (L4) diminue l'activité de conversion d'A.A. en 12-HETE que possède la protéine 12-lipoxygénase de forme normale LN10. La purification de ces deux protéines n'impacte pas leur capacité de conversion de l'acide arachidonique en 12-HETE.

De la même manière qu'observée sur des extraits de protéines totales de cellules COS-7 transfectées, après purification, la forme courte L4 de la 12LOX semble donc avoir un rôle régulateur sur la forme normale LN10 de cette enzyme.

D/ Discussion

Les travaux de cette étude ont permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de l'enzyme 12-lipoxygénase dans l'utérus de brebis (*Ovis aries*), plus particulièrement au sein des tissus épithéliaux constitutifs de l'endomètre (luminal, glandulaire) dans lesquels est détecté son transcrite. Ce travail reste original dans la mesure où aucune étude n'avait été menée jusqu'alors pour la recherche de cette enzyme dans l'utérus ovin. Les quelques travaux publiés chez cette espèce ont été effectués sur des tissus autres que le tractus reproducteur. Plusieurs études ont été menées sur la 12-lipoxygénase leucocytaire ovine à partir de cellules épithéliales de trachée en culture (Shornick *et al.*, 1993) ou encore sur la 12-lipoxygénase plaquettaire chez cette même espèce (Ferrandiz *et al.*, 1990). Certains travaux ont été réalisés également chez le bélier à partir de préparations microsomales issues de vésicules séminales (Hecker *et al.*, 1987). En revanche, parmi les ruminants, la vache (*Bos taurus*) reste une espèce de référence à partir de laquelle de nombreuses études concernant cette famille d'enzymes ont été menées. Les noms des lipoxygénases identifiées chez l'espèce bovine ont permis d'établir la première classification de ces molécules en fonction de leur localisation tissulaire (pour exemples, 12-lipoxygénase plaquettaire ou cornéenne, 12-lipoxygénase leucocytaire ou trachéale). Des travaux plus récents ont permis de mettre en évidence l'impact des lipoxygénés et de leurs métabolites au sein de l'endomètre bovin au cours du cycle œstral (Korzekwa *et al.*, 2010).

I- Bilan expérimental du projet

Nous avons pu mettre en évidence, plus particulièrement, chez la brebis, la production par l'endomètre utérin d'un métabolite issu de l'activité enzymatique de la 12-lipoxygénase, le 12-HETE (acide 12 Hydroxy-EicosaTétraEnoïque). Ce composé est majoritaire parmi les métabolites issus de l'acide arachidonique au sein de ce tissu. L'enzyme qui en est à l'origine est une 12-lipoxygénase (ALOX12) de type plaquettaire, dont le transcrite est majoritairement présent dans l'utérus, par comparaison à d'autres tissus épithéliaux tels que la cornée, la trachée, la surrénale, la rate ou encore le poumon.

Plus précisément, la recherche du transcrite de cette enzyme a permis de mettre en évidence l'existence de deux variants d'épissage. Ces deux transcrits diffèrent l'un de l'autre par la disparition du dernier exon (exon 14) avec conservation d'une séquence codante, laissant alors supposer l'existence de deux protéines putatives au sein de l'endomètre ovin. Le transcrite ALOX12 dit "normal" ou "long", comprenant 14 exons (soit 3,2 Kb) est présent tout au long du cycle œstral de la brebis. Le transcrite court (2,6 Kb), en revanche, apparaît vers le 12^{ème} jour en début de gestation, de façon concomitante au transcrite normal, soit à l'approche de l'implantation de l'embryon, dans un environnement hormonal marqué par un taux élevé de progestérone circulante.

Nous avons émis l'hypothèse que l'utérus ovin possède la capacité de produire les deux protéines issues de la traduction des deux transcrits. Ne disposant pas des moyens d'extraction de ces protéines natives, une stratégie de surexpression de celles-ci *in vitro* a été mise en place de façon à pouvoir caractériser ces protéines. Deux types de vecteurs plasmidiques ont été conçus : l'un pour une expression en modèle procaryote (*E. coli*), l'autre pour une expression par transfection transitoire en lignée de cellules eucaryotes (COS-7). Les ADNc correspondant à chacun des transcrits, identifiés préalablement par *RACE*, ont été synthétisés *in vitro* et insérés dans les vecteurs. Les constructions plasmidiques utilisées ont permis d'obtenir deux versions de chacune des protéines (avec et sans queue ou "Tag" Poly-Histidine) dans l'objectif de pouvoir les purifier. Les protéines recombinantes des deux formes ont été produites. Leur détection a été faite grâce à deux anti-peptides, spécifiques de chacune des formes, produits au laboratoire par immunisation de lapins dans le même temps. Nous avons effectué des tests pour caractériser ces immunsérums.

Les protéines totales ont été extraites à partir des deux modèles de production utilisés (procaryote, eucaryote). L'utilisation de détergents de diverses natures n'a pas permis d'obtenir un rendement élevé de protéines recombinantes sous forme soluble, une grande majorité d'entre elles restant dans le culot d'extraction, liées aux membranes cellulaires ou

dans la fraction microsomale. Néanmoins, une purification de la fraction soluble disponible des protéines recombinantes à queue poly-Histidine a été menée pour chacune des formes de 12-lipoxygénase sur colonnes par Chromatographie d’Affinité avec des Ions Métalliques cobalt Co^{2+} Immobilisés (IMAC).

L'activité biologique des deux enzymes produites a été testée : seule l'enzyme correspondant au transcrit de forme "normale" est active, y compris en présence du Tag Histidine, et a donc la capacité à convertir l'acide arachidonique en métabolite 12-HETE. La forme "courte" de la protéine semble être totalement inactive. Un test de conversion de l'acide arachidonique a été également effectué avec la présence concomitante des deux formes de 12-lipoxygénase recombinantes. L'activité biologique de la forme normale de la 12-lipoxygénase diminue lorsque la quantité de protéine de forme courte augmente. Cette observation suggère un potentiel rôle de régulation de l'activité de la forme longue par la forme courte.

II- Analyse des transcrits et conséquences sur la synthèse des protéines correspondantes

1. Expression du transcrit de la 12-lipoxygénase dans divers tissus ovins

De nombreuses études ont révélé la présence de cette enzyme dans des tissus de nature épithéliale chez les ruminants. La première classification des Lipoxygénases de mammifères trouve d'ailleurs son origine dans les localisations tissulaires de ces enzymes. Ainsi, une 12-lipoxygénase de type plaquettaire (ou cornéenne) et une 12-lipoxygénase de type leucocytaire (ou trachéale) ont été décrites chez le bovin. Ces mêmes types sont retrouvés chez l'espèce humaine (Siegel *et al.*, 1980; Flatman *et al.*, 1986). Une 12-lipoxygénase épidermique a été observée chez la souris (Krieg *et al.* 2013). La 12-Lipoxygénase de type leucocytaire n'a pas été détectée uniquement dans les leucocytes mais également dans d'autres types de tissus non-hématopoïétiques tels que la trachée bovine (Hansbrough *et al.* 1990), la glande pituitaire antérieure porcine (Ueda *et al.*, 1990), le cerveau de chien (Nishiyama *et al.* 1992) ou encore la glande pinéale de rat (Hada *et al.*, 1994). Le type plaquettaire a été décrit dans les plaquettes sanguines de bon nombre d'espèces mais également dans les cellules de peau humaine ou murine (Siegel *et al.* 1980; Takahashi *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994).

Notre projet nous a permis de définir le type plaquettaire auquel appartient la 12-lipoxygénase d'utérus ovin par une technique de RT-PCR, après identification de la séquence entière du transcrit par une technique de RACE. L'analyse d'expression du transcrit de la 12-lipoxygénase ovine a également été menée par une technique de Northern blot dans divers tissus de brebis : rate, poumon, surrénale, trachée, cornée, endomètre et peau. Le choix du poumon, de la rate et du rein a été guidé par les articles d'(Hada *et al.* 1994), (Yokoyama *et al.*, 1983) et (Takahashi *et al.* 1993). Nous avons observé que seuls l'endomètre, la trachée, la peau et la cornée de brebis présentent une bande unique visible correspondant au transcrit recherché. L'endomètre reste le tissu exprimant le plus fortement le transcrit *ALOX12* parmi ceux testés. L'absence de signal obtenue pour la rate, le poumon et la surrénale nous permet de suggérer que le type de 12-lipoxygénase présent dans ces tissus pourrait être le type leucocytaire. Cette hypothèse est confortée par les travaux de (Kawajiri *et al.*, 2000) qui décrivent ce type dans ces tissus chez le rat. Néanmoins, d'autres auteurs, (Hagmann *et al.*, 1995) et (Bhowmick *et al.*, 2013), ont décrit une 12-lipoxygénase de type plaquettaire dans les cellules pulmonaires humaines en lignée. L'absence de signal dans les trois tissus ovins (surrénale, rate, poumon) pourrait être due soit à la présence d'une 12-lipoxygénase de type leucocytaire non détectable avec la sonde ADN de type plaquettaire, soit à un niveau d'expression des transcrits de la 12-lipoxygénase de type plaquettaire trop faible dans ces tissus pour être détectable.

Enfin, la détection d'une bande unique en Northern blot dans l'endomètre, la trachée, la peau et la cornée attestent de la présence d'une seule forme de transcrit de l'enzyme (forme "normale"). La sonde ADN Antisens utilisée est spécifique des exons 12 à 14 du transcrit de

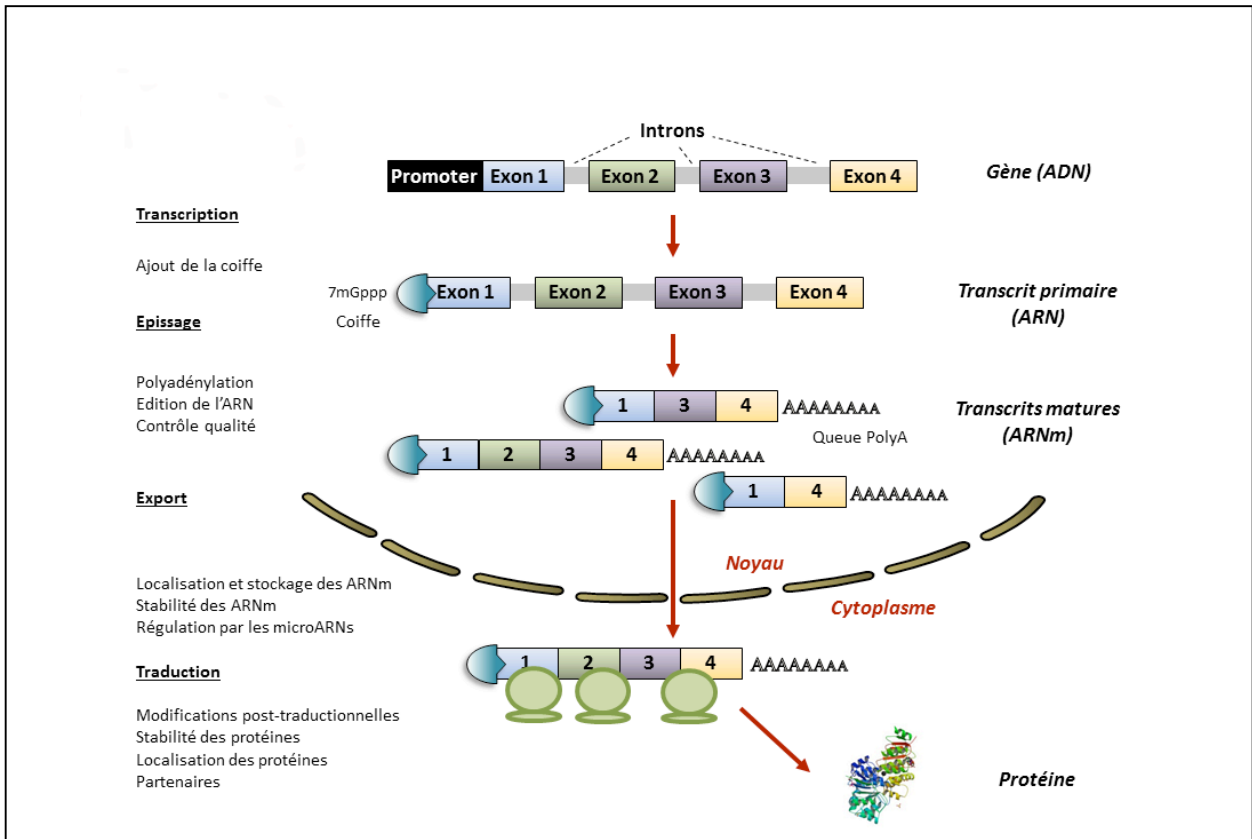


Figure 55 *Processus de maturation d'un transcrit primaire par différentes transformations post-transcriptionnelles au sein du noyau de la cellule (Samaan et al., 2015)*

Chaque transcrit primaire subit 3 phénomènes avant d'être "mature" et éligible pour la traduction en protéine : addition d'une coiffe en 5' du transcrit, addition d'une queue poly A en 3' et enfin l'épissage.

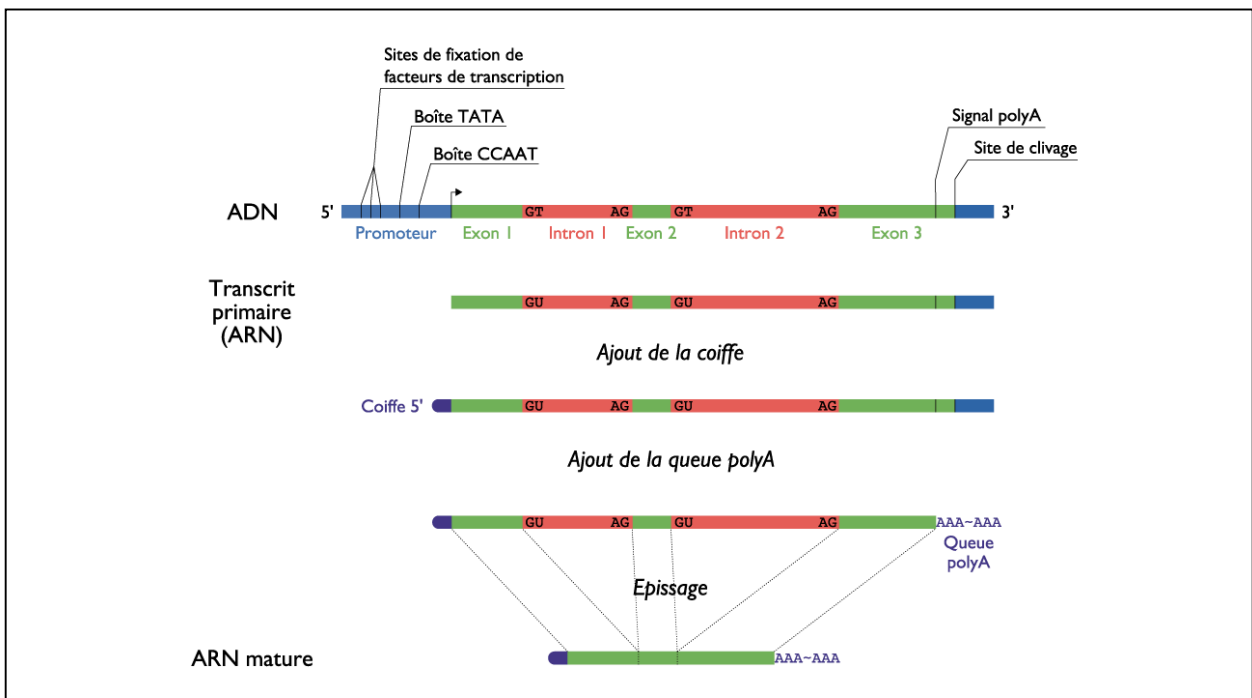


Figure 56 *Processus de maturation des transcrits primaires (Fontaine 2009)*

la 12-lipoxygénase de forme "normale". Or la forme courte du transcrit ne possède pas l'exon 14 (voir *point suivant*) et ne peut donc être révélée.

2. Existence de variants d'épissage potentiellement traductibles en protéines : Analyse des séquences des deux transcrits de la 12-lipoxygénase ovine

Le bilan établi du projet soulève quelques interrogations quant aux résultats obtenus. Ce projet trouve son origine dans les premières observations que j'ai faites au laboratoire (voir chapitre "A/ Introduction paragraphe III- 1. Contexte et résultats préliminaires"), et qui justifient son existence. La description de deux transcrits codant pour la 12-lipoxygénase n'a jamais été décrite dans l'espèce ovine.

En revanche, une étude d'expression des lipoxygénases dans les tissus utérins chez la femelle babouin, au dernier trimestre de gestation et au moment de la parturition (Smith *et al.* 2001), a montré la présence de deux transcrits spécifiques de la 12-lipoxygénase plaquettaire (2,5 et 2,2 Kb) par Northern blot dans le myomètre, le col utérin et le chorion. L'hypothèse d'un épissage alternatif est avancée par les auteurs.

Ce même constat effectué chez l'ovin dans notre étude, suivi du séquençage des deux transcrits clonés (3,2 et 2,6 Kb), nous permet de confirmer l'existence de variants issus d'épissage alternatif.

L'analyse par RACE a permis d'identifier les séquences entières de nos deux transcrits 12-lipoxygénase : ces deux transcrits présentent une extrémité 5' coiffée ("5' end capped"), une extrémité 3' munie d'une queue polyA, les introns ayant été retirés, suggérant alors qu'ils puissent être traduits en deux protéines respectives (voir *Figures 55 et 56*).

L'alignement de chacune des séquences obtenues avec la séquence ovine de 12-lipoxygénase de la banque *Ensembl* (N° accession ENSOART00000010081) confirme que ces deux transcrits identifiés par RACE correspondent bien au transcrit de la 12-lipoxygénase.

Le séquençage des deux transcrits clonés (transcrit "normal" 3,2 Kb et transcrit court 2,6 Kb) nous confirme la structure commune de chacun des messagers (5' UTR/Codon START/Séquence codante/Codon STOP/3' UTR). La disparition complète du dernier exon et du début de la partie 3' UTR observée pour le transcrit court de la 12-lipoxygénase ovine atteste de ce phénomène d'épissage alternatif, avec un cadre de lecture conservé.

Les deux transcrits identifiés pour la 12-lipoxygénase ovine (court 12LOX L4 et normal 12LOX LN10) possèdent tous les deux le même 5' UTR. La séquence KOZACK, séquence conservée retrouvée sur tous les ARNm eucaryotes au niveau du site de démarrage de la traduction, autour du codon de démarrage AUG, est retrouvée pour chacun des deux transcrits (séquence consensus gccRcc**AUGG** où R représente une purine (le codon de démarrage est en gras et les nucléotides en minuscules sont moins conservés que le reste de la séquence)). La traduction de chacun des transcrits identifiés est donc potentiellement possible. En revanche, leurs séquences 3' UTR diffèrent puisque le transcrit "normal" comporte un 3' UTR de 846 bases nucléotidiques alors que le transcrit court n'en comporte que 156.

3. Expression des 2 transcrits de la 12-lipoxygénase pendant le cycle œstral et en début de gestation : Influence de l'environnement hormonal

Une RT-PCR aux 9^{ème} et 14^{ème} jours de gestation sur des endomètres ovins ainsi qu'une étude de cinétique d'expression par Northern blot des transcrits de la 12-lipoxygénase ovine sur des cellules luminales (pendant le cycle œstral et en début de gestation) ont été effectuées. Nous avons pu montrer que le niveau d'expression du transcrit normal de la 12-lipoxygénase ovine est influencé par le taux de progestérone circulant. Pendant le cycle œstral, ce taux est à son maximum entre les 10^{ème} et 14^{ème} jours, période pendant laquelle le transcrit "normal" de la 12LOX est le plus exprimé. En début de gestation, à partir du 10^{ème} jour, période au cours de laquelle le corps jaune gestatif est maintenu et assure la production de progestérone, le niveau maximal d'expression du transcrit est le plus élevé, son maximum se situant aux alentours du 12^{ème} jour, et se maintient au moins jusqu'au 16^{ème} jour. Ainsi, la forme "normale" du transcrit de la 12-lipoxygénase est présente pendant toute la durée des périodes explorées. En revanche, l'apparition de la forme courte du transcrit de la 12-lipoxygénase semble concerner essentiellement la période péri-implantatoire, au cours de laquelle la progestérone produite par le corps jaune est fortement présente. Cette période est liée à la présence d'un embryon *in utero* et à l'apposition et le début d'implantation de ce dernier. L'expression du transcrit court de la 12-lipoxygénase semble donc être concomitante à l'élongation de l'embryon et le début de son implantation. En comparaison, il a été décrit que l'expression de transcrits de 12/15-Lipoxygénases, de type leucocytaire et de type épidermal, dans l'utérus de souris en début de gestation, soit liée à l'environnement hormonal (Li *et al.*, 2004). Plus précisément, des souris ovariectomisées ou dont le récepteur à la progestérone (ou PGR) n'est pas présent (souris KO pour le PGR) n'expriment pas de transcrit des 12/15-Lipoxygénases de type leucocytaire ou épidermal. En revanche, une injection de progestérone chez des souris ovariectomisées mais de type sauvage (avec présence du récepteur de la progestérone) restaure l'expression des 2 types de 12/15 Lipoxygénases. Ces résultats montrent que l'expression des 12/15-Lipoxygénases utérines est régulée par la progestérone et son récepteur. De plus, l'induction de l'expression des transcrits de deux types de 12/15-Lipoxygénase coïncide avec le début d'implantation dans l'utérus murin gravide. Le niveau d'expression de ces Lipoxygénases est plus élevé au moment de l'implantation (transcrits et protéines). Dans notre cas, chez l'ovine, il est clairement établi que le taux de progestérone circulant influence le niveau d'expression du transcrit de la 12-lipoxygénase et l'étude d'expression de la protéine confirme cette observation puisque sa cinétique suit celle du transcrit (voir plus loin).

De façon équivalente, nous avons mené au laboratoire une étude d'expression du transcrit de la 12-lipoxygénase dans l'endomètre ovin, avant le démarrage du projet (*données non montrées dans ce mémoire*). Des brebis ovariectomisées ont reçu un traitement par progestérone exogène pendant 10 ou 14 jours. Après euthanasie au 14^{ème} jour, dans les deux cas, l'expression des transcrits de la 12-lipoxygénase a été analysée par RT-qPCR dans l'endomètre. L'étude révèle que les brebis traitées pendant 10 jours présentent un taux de transcrits trois fois plus important que celles traitées pendant 14 jours. Ce résultat conforte l'observation faite par Northern blot pendant le cycle œstral ovin (voir *Chapitre "A/ Introduction III- 1.Contexte et résultats préliminaires"*).

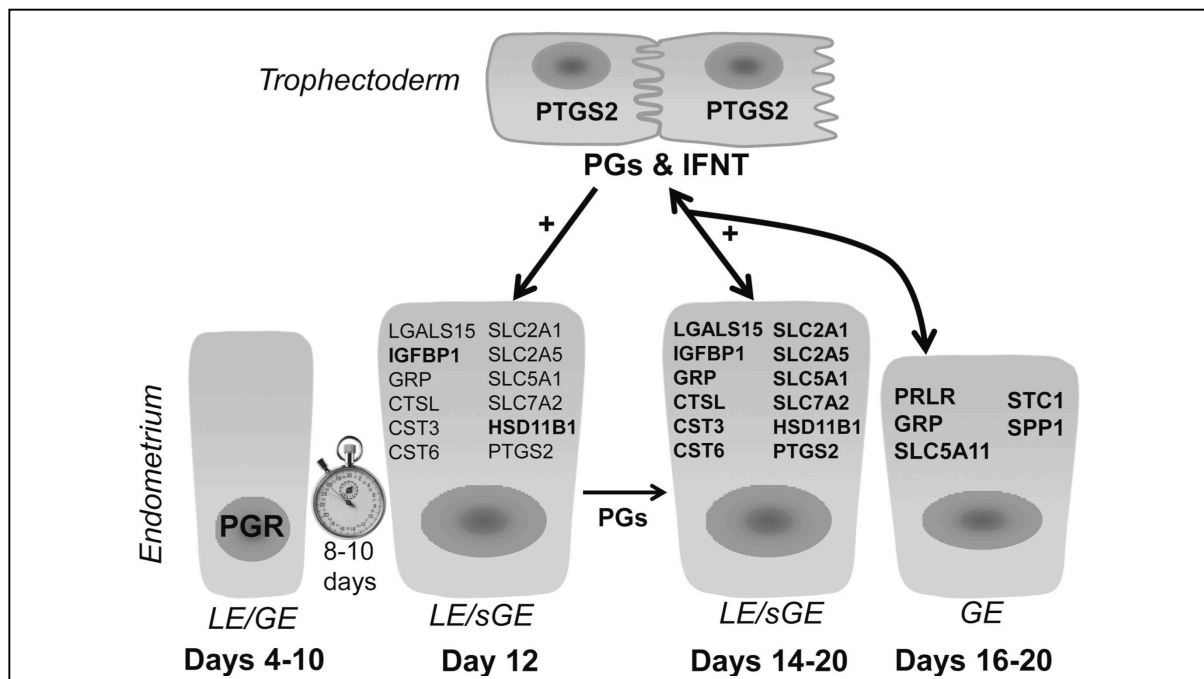


Figure 57 Effets des hormones ovariennes et des facteurs issus de l'endomètre et du trophoctoderme embryonnaire sur l'expression de gènes en lien avec l'élongation et l'implantation de l'embryon. Expression de ces gènes dans les épithéliums endométriaux de l'utérus ovin pendant la gestation précoce (Spencer et al. 2016)

L'action de la Progestérone (P4) action pendant 8 à 10 jours diminue l'expression de son récepteur (PGR). La perte de PGR est corrélée avec l'induction d'un bon nombre de gènes endométriaux dans les épithéliums luminal (LE) et glandulaire superficiel (GE). Parmi ces gènes, *PTGS2* (ou *COX2*) est impliqué dans la synthèse de prostaglandines chez la brebis en cycle comme en gestation. Chez la brebis en gestation, le trophoctoderme embryonnaire produit et sécrète des prostaglandines et de l'Interféron Tau (IFN τ) qui agissent sur l'endomètre de façon spécifique afin d'augmenter l'expression de gènes progestérone dépendants, gouvernant les fonctions endométriales ou l'élongation du conceptus.

LE = luminal epithelium GE = glandular epithelium.

Ce projet nous a permis de mettre en évidence la capacité de l'utérus ovin à produire des dérivés lipoxygénés issus du métabolisme de l'acide arachidonique *via* la voie de la 12-lipoxygénase. Nous avons pu ainsi évaluer l'expression de l'enzyme au niveau transcriptionnel démontrant l'existence d'un ARNm majeur et d'un variant d'épissage. Chacun des deux transcrits a été caractérisé en terme de séquence et les profils d'expression sont différents au cours du cycle œstral et en début de gestation, le transcrit court apparaissant au moment où le taux de progestérone (P4) circulant est le plus élevé, en début de gestation. Le niveau d'expression des deux transcrits diminue :

- après le 12^{ème} jour du cycle, suivant ainsi la baisse du taux de progestérone,
- après 14 jours de gestation, alors que le taux de progestérone est maintenu élevé par le corps jaune gestatif.

Cette dernière observation suggère qu'en début de gestation, en période post-implantatoire, le taux de progestérone n'influence plus à lui seul l'expression de la 12-lipoxygénase. La baisse observée du niveau du transcrit semble lié à la présence de l'embryon et influencé par un ou plusieurs autres facteurs. Il est établi que le maintien de la gestation chez les ruminants est assuré par différents acteurs moléculaires d'origine utérine que sont la progestérone, l'IFN τ et les prostaglandines. La mise en place de la gestation chez les ruminants englobe la croissance du blastocyste après l'éclosion, l'allongement du conceptus (embryon et membranes extra-embryonnaires), et la suppression du mécanisme lutéolytique de l'endomètre pour maintenir la production de progestérone par l'ovaire (Spencer *et al.* 2016). Il est connu que la progestérone stimule et maintient les fonctions endométriales nécessaires à la survie des embryons, la croissance, l'implantation, la placentation, et le développement à terme du conceptus. Pendant le cycle œstral et en début de gestation, la progestérone induit l'expression d'un ensemble de gènes endométriaux permettant la réceptivité utérine, rendant alors possible la croissance du conceptus et son implantation (Satterfield *et al.*, 2006; Spencer *et al.* 2016). L'initiation de l'expression de ces gènes exprimés dans les épithéliums endométriaux requiert l'action de la progestérone du jour 10 à 12 dans l'épithélium luminal, entre les jours 12 à 16 dans l'épithélium glandulaire (voir *Figure 57 et Tableau 14*). Ainsi, une augmentation du taux de progestérone engendre une augmentation de l'expression du gène *PTGS2* (= *COX2*) et par conséquent la synthèse des dérivés cyclooxygénés, à compter du 14ème jour de gestation. C'est à ce moment où une diminution de l'expression du transcrit de la 12-lipoxygénase est observée. Ainsi, l'AA semble la voie des cyclooxygénases au détriment de celle des lipoxygénases au moment de l'implantation de l'embryon.

III- Recherche des protéines correspondantes à la 12-lipoxygénase endométriale

1. Obtention des anti-peptides et fonctionnalité de ces réactifs

Pour déterminer la présence de chacune des protéines 12-lipoxygénase (forme courte L4 et forme normale LN10) dans les tissus ovins, disposer d'anticorps spécifiques de chacune d'entre elles est une nécessité. De tels anticorps spécifiques n'étant pas disponibles dans le commerce, nous avons dû les produire au laboratoire par immunisation de lapins. Au début du projet, nous ne disposions pas de protéines extraites et purifiées correspondant aux deux formes de la 12-lipoxygénase, l'immunisation par injection de protéines natives n'a donc pas été possible. Les protéines recombinantes sont des protéines artificiellement fabriquées grâce à un vecteur bactérien ou cellulaire (levure, cellule en culture). Nous ne disposions pas, non plus, de protéines recombinantes correspondantes. Aussi, nous avons opté pour la fabrication d'anticorps anti-peptides.

Tableau 14 Effets de la progestérone ovarienne (P4) et de l'infusion intra utérine d'interféron Tau (IFNT) ou de prostaglandines (PG) sur les gènes impliqués dans l'élongation et l'implantation. Ces gènes sont exprimés par les épithéliums de l'endomètre utérin ovin¹ (Spencer et al., 2016)

Gene symbol	P4	IFNT	PG ²
Transport of glucose			
<i>SLC2A1</i>	↑	+	+
<i>SLC2A5</i>	n.d.	n.e.	+
<i>SLC2A12</i>	n.d.	+	n.e. or +
<i>SLC5A1</i>	↑	+	n.e. or +
<i>SLC5A11</i>	↑	+	n.e. or +
Transport of AA			
<i>SLC1A5</i>	n.d.	n.d.	+
<i>SLC7A2</i>	↑	+	n.e.
Cell proliferation, migration, attachment			
<i>GRP</i>	↑	+	+
<i>IGFBP1</i>	↑	+	++
<i>LGALS15</i>	↑	++	++
<i>SPP1</i>	↑	+	n.d.
Proteases and their inhibitors			
<i>CTSL1</i>	↑	++	n.e. or +
<i>CST3</i>	↑	+	n.e. or +
<i>CST6</i>		+	n.e.
Intracellular enzymes			
<i>HSD11B1</i>	↑	+	++
<i>PTGS2</i>	↑	n.e. (+ activity)	n.e. (+ activity)

¹Effect of hormone or factor denoted as induction (↑), stimulation (+), no effect (n.e.), or not determined (n.d.).

²Summary data for infusion of PGE₂, PGF_{2α}, or PGI₂ (Dorniak et al., 2011).

Les séquences peptidiques déduites nous indiquent que la forme 12LOX L4 est raccourcie de 31 a.a. par comparaison à la forme normale 12LOX LN10 comportant 663 a.a., les 604 premiers a.a. étant communs entre les deux formes. Les peptides ont été définis sur les parties C-Terminales des séquences.

Des tests d'immunolocalisation sur coupes de tissu utérin fixé, à divers stades du cycle et de la gestation, en paraffine comme en congélation, ont été effectués (*données non montrées dans ce mémoire*). Les immunosérums de lapins, spécifiques de chacune des formes de la 12-lipoxygénase ovine, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence des deux formes de la protéine dans ce tissu, y compris après purification sur colonnes d'affinité. Un marquage ubiquitaire est observé avec l'anti-peptide correspondant à la forme "normale" de la 12-lipoxygénase et aucun marquage n'apparaît avec l'anti-peptide spécifique de la forme courte.

En revanche, la présence de la protéine 12-lipoxygénase ovine sous sa forme courte et sa forme normale est révélée par la technique de Western blot en utilisant les deux anti-peptides spécifiques, lors d'expérimentations de surexpression en cellules COS-7 *in vitro*. La bande à la taille attendue disparaît après immunoneutralisation préalable par le peptide correspondant. Cela permet donc de confirmer que chaque immunosérum polyclonal de lapin présente au moins un type d'IgG reconnaissant la protéine 12-lipoxygénase (forme courte ou longue selon le cas). Dans les extraits de cellules lumineales ovines, seule la forme normale est détectable avec l'anti-peptide spécifique.

Néanmoins, des profils multibandes ont été observés avec chaque immunosérum sur les cellules COS-7 transfectées : une bande principale intense dont la taille observée correspond à celle de la protéine recherchée et 4 à 5 bandes de tailles inférieures et d'intensités plus faibles. L'ensemble des bandes disparaît en présence du peptide suggérant que ces protéines correspondent à la 12-lipoxygénase mais dont la traduction serait incomplète ou encore à des résidus de clivage. S'il s'agissait de produits de dégradation, ou de protéines clivées, les profils se présenteraient plutôt sous forme de "Smears", ou bien des bandes plus petites et plus "floues" apparaîtraient.

La production de protéines recombinantes *in vitro* a été décrite dans de nombreux travaux. Diverses approches ont été utilisées :

- Production en système cellulaire procaryote (*E. coli*),
- Production en système cellulaire eucaryote (Levure, cellules de mammifères en lignées telles les COS-7, CHO; HEK 293...),
- Production en système acellulaire (lysat de réticulocytes de lapin, extrait de germe de blé...).

Ces technologies ne sont pas parfaites et des intermédiaires de traduction peuvent apparaître dans la production d'une protéine recombinante *in vitro*. Les bandes surnuméraires présentes sur les blots (avec les anti-peptides 12LOX L4 ou LN10) représentent probablement ces intermédiaires de traduction puisque des travaux ont été publiés, mentionnant ce phénomène en cellules COS-7 transfectées (Fennell *et al.*, 2014) comme dans d'autres systèmes acellulaires (Shields *et al.*, 1978; Iwamuro *et al.*, 1999).

Les séquences peptidiques déduites des transcrits court et long de la 12-lipoxygénase ovine révèlent la présence de plusieurs Méthionines (18 au total), qui pourraient être à l'origine d'une traduction anarchique mal régulée dans la lignée de cellules dérivées de rein de singe vert, transformées par le virus SV40. Nous pouvons alors obtenir autant d'intermédiaires potentiels de traduction reconnus en leur partie C-terminale par les anti-peptides utilisés. Certains d'entre eux ont des tailles théoriques très proches et de ce fait ne peuvent être distingués individuellement en gel SDS PAGE à 10%.

Ces diverses observations attestent donc de la fonctionnalité des anti-peptides utilisés. Ces anti-peptides, fonctionnels en Western blot mais inutilisables en immunohistochimie, nous font suggérer un problème de conformation des protéines recherchées. Un peptide a une structure primaire linéarisée. La technique de western blot utilise des extraits protéiques dénaturés, ce qui facilite la détection des protéines. *A contrario*, les protéines des coupes de tissus conservent une structure tridimensionnelle ne permettant pas toujours l'accès des anticorps à leurs déterminants antigéniques.

L'analyse par Western blot à l'aide d'anti-peptides spécifiques de chacune des formes atteste de la présence de la forme normale 12LOX LN10 dans les cellules luminales pendant le cycle œstral et en début de gestation. *A contrario*, la forme courte de la 12-lipoxygénase (12LOX L4) n'a pas pu être mise en évidence par cette technique *ex vivo*.

Cette absence de détection de la forme courte est-elle due à un problème technique (problème lié à l'immunsérum anti-peptide L4 utilisé) ou bien cette forme courte est-elle en quantité si faible dans les tissus qu'il nous est impossible de la détecter par Western blot?

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Une instabilité de cette forme. Cette hypothèse ne peut être retenue puisque cet anti-peptide 12LOX L4 révèle la forme courte par Western blot sur cellules COS-7 transfectées.

- Une faible quantité de protéine 12-lipoxygénase de forme courte produite dans les cellules luminales utérines. Le seuil de détection de l'anti-peptide L4 pourrait être trop bas pour permettre la mise en évidence de cette forme ou encore son affinité trop faible (L'affinité d'un anticorps est l'intensité de la réaction entre un déterminant antigénique unique et un seul site de liaison de l'anticorps).

- Enfin, le peptide utilisé pour la forme courte L4, dont la séquence a été définie à partir de la traduction *in silico* de la séquence du transcrite court de la 12-lipoxygénase ovine, est peut-être insuffisamment immunogène pour une détection dans les tissus. Un autre peptide de séquence différente ou la protéine recombinante purifiée pourraient être testés par injections à des lapins.

2. Purification des immunsérums anti-peptides produits au laboratoire

Parmi les sérums obtenus par immunisation de lapins à l'aide de peptides spécifiques de chacune des formes de 12-lipoxygénase, seuls les immunsérums entiers ont été utilisables. La purification des sérums anti-peptides (12LOX L4, 12LOX LN10) par chromatographie d'affinité selon diverses technologies (*Sulfolink®*, *HiTrap™ NHS activated HP* ou *protéine A*) n'ont pas permis d'obtenir des titres élevés en IgG. Leur utilisation en Western blot a permis la détection des protéines recombinantes 12LOX L4 forme courte sur extraits de cellules COS-7. En revanche, aucune détection par Western blot n'a été possible pour le sérum 12LOX LN10 forme normale purifié par les mêmes méthodes.

Les immunsérums entiers, en revanche, permettent la détection des deux formes de 12-lipoxygénase sur ces mêmes cellules transfectées. C'est la raison pour laquelle ils ont été utilisés non purifiés au risque d'avoir des bandes aspécifiques (limitées par l'utilisation de sérum normal de brebis dans nos conditions de Western blot).

Nous ne disposons que d'un seul immunsérum de lapin dirigé contre un peptide spécifique correspondant aux 17 derniers acides aminés de la séquence protéique déduite 12LOX L4. Le peptide utilisé pour l'immunisation du lapin est peut-être insuffisamment immunogène. On peut imaginer également être en présence d'un sérum issu d'un lapin dont la réponse immunitaire fut faible. Nous pouvons envisager de rechercher la protéine 12-lipoxygénase de forme courte en changeant de peptide d'immunisation tout en restant sur la zone C-terminale de la protéine qui diverge de celle de la forme normale de la 12-lipoxygénase. Le nouvel immunsérum de lapin obtenu devra alors être testé dans les mêmes conditions de Western blot. Le nouvel anti-peptide produit pourrait être plus affiné et permettre la détection de quantités de protéines 12LOX L4 mêmes faibles.

3. Absence de détection de la forme courte de la protéine 12LOX L4

Dans l'éventualité où cette forme courte de la 12-lipoxygénase ovine serait réellement inexistante dans l'utérus ovine pendant le cycle œstral et en début de gestation, malgré la présence du transcrite correspondant, plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- La région 3' UTR intervient dans la stabilité, la localisation, la traduction et la dégradation des ARNm produits (Matoulkova *et al.*, 2014). Partant de ce constat, le transcrite de la 12-lipoxygénase de forme courte peut subir un défaut de stabilité en raison d'une séquence 3'

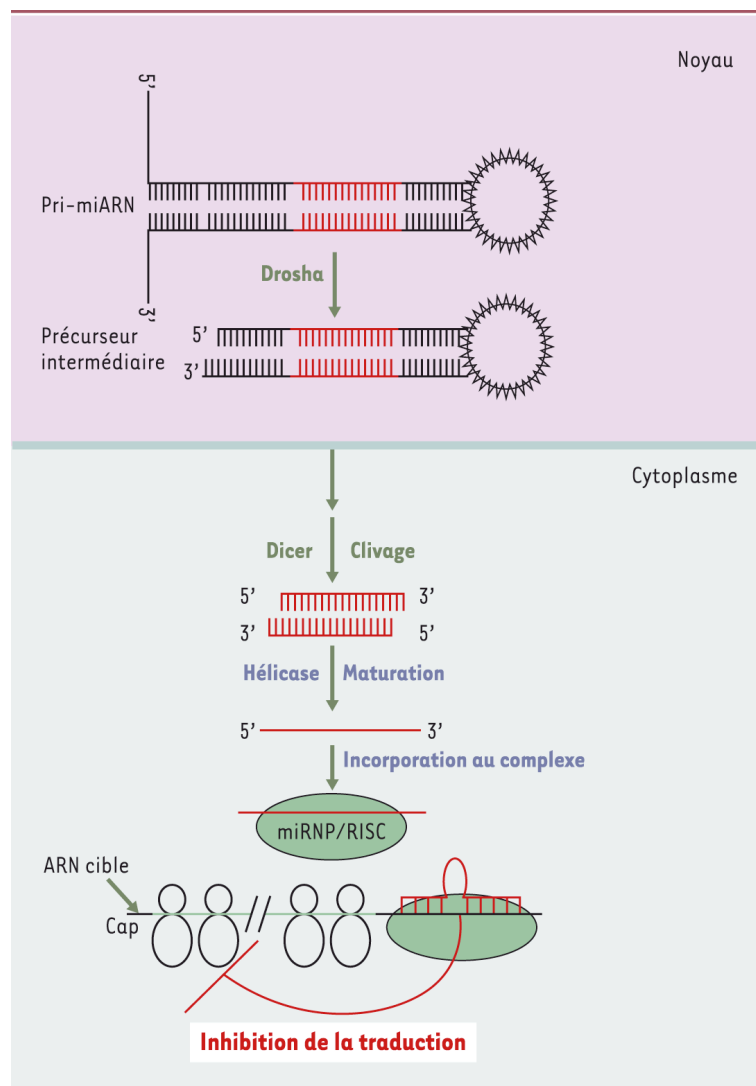


Figure 58 Voie de biogenèse d'un microARN et mode d'action chez les métazoaires (Hartmann et al., 2004)

Le pri-microARN double brin (Pri-miARN), transcrit à partir du gène, donne naissance à un ARN double brin (précurseur intermédiaire) par action d'une ribonucléase Drosha. Après une exportation active du précurseur dans le cytoplasme, une forme double brin du microARN est produite par l'action de la protéine Dicer. Une étape de maturation supplémentaire, à laquelle participe vraisemblablement une hélicase, est ensuite nécessaire avant que le microARN simple brin mature se fixe sur le complexe miRNP/RISC (*microRiboNucleoProtein/RNA-Induced Silencing Complex*). Ce complexe guide ensuite le microARN vers la région 3' non codante (3' UTR) de l'ARNm cible. Après hybridation imparfaite entre le microARN et la cible, la traduction de la protéine correspondante est inhibée.

UTR raccourcie, ce qui pourrait expliquer l'absence de détection de la protéine correspondante dans les cellules luminales. Mais l'instabilité du transcrit ne peut être évoquée ici puisque sa détection est possible par Northern blot et que la RACE a permis de l'identifier.

- Une modification de la localisation de la protéine produite en lien avec la modification de la région 3' UTR du transcrit correspondant. Cette idée ne peut être retenue puisque des tests par Western blot ne permettent pas de révéler sa présence dans des extraits entiers de protéines de cellules luminales.

Une hypothèse pourrait justifier l'absence de détection de la protéine sous sa forme courte : l'existence d'un micro-ARN spécifique (ou miARN) dans les cellules luminales ovines (Hartmann *et al.* 2004) (Lutz *et al.*, 2013). Il s'agit d'un régulateur post-transcriptionnel capable d'éteindre l'expression d'un gène par fixation sur le transcrit correspondant. Son appariement à l'ARN messager du gène cible conduit à l'inhibition de la traduction en protéine (voir *Figure 58*). Ce miARN, s'il existe, doit être spécifique de la région 3' de l'ARNm codant pour la forme courte de la 12-lipoxygénase, région qui ne doit pas être homologue avec celle du transcrit normal, sous peine alors d'engendrer l'extinction des deux messagers à la fois. Ainsi, une recherche de miARN dont la séquence est complémentaire de la zone encadrant le codon STOP (TAA) serait à envisager.

Enfin, pour rechercher l'existence d'une forme courte de la protéine 12-lipoxygénase, si cette dernière est réellement exprimée, Il serait envisageable de réaliser une analyse par spectrométrie de masse d'un extrait de protéines totales de cellules luminales ovines au 12ème jour de gestation. Une migration préalable sur gel SDS-PAGE de cet extrait devra être réalisée afin de limiter la zone d'étude aux protéines dont le poids moléculaire se situe entre 60 et 75 KDa, les extraits de protéines totales regroupent des milliers de protéines exprimées par les cellules d'origine. Si la protéine 12LOX forme courte est "rare" au sein de ce mélange, il nous sera donc nécessaire de circonscrire notre zone de recherche afin d'optimiser nos chances de la retrouver par spectrométrie de masse.

4. Extraction et purification des protéines recombinantes 12-lipoxygénase : problème de solubilisation en phase aqueuse

4.1. Protéines recombinantes 12-lipoxygénase : taguées ou non...

Malgré le faible rendement de solubilisation des protéines recombinantes en phase aqueuse, la purification de ces dernières a été possible. Les fractions chromatographiques obtenues ont néanmoins mis en évidence une faible quantité de protéines avec une extrémité Histidine (tag Histidine) sur l'ensemble des protéines recombinantes synthétisées en cellules COS-7 transfectées par plasmides pCMV 12LOX avec Tag. L'observation des chromatogrammes de purification permet de constater que le pic correspondant au front de chromatographie renferme une quantité importante de protéines recombinantes produites, en version non taguée. Ces protéines ne sont donc pas retenues en totalité sur la colonne et passent à travers la matrice dès le début de la purification. Le pic d'élution, quant à lui, correspond à une quantité de protéines en versions taguée poly-Histidine et non taguée, détectables avec l'anti-peptide 12LOX LN10. Les protéines taguées poly-Histidine sont détectées par l'anti-HIS Tag dans ce pic d'élution. On retrouve des quantités faibles dans les fractions suivant le pic d'élution, preuve d'un décrochage progressif des protéines taguées HISTIDINE de la colonne avec passage du tampon d'élution appliqué (Tampon 0,05 M Phosphate 0,3 M NaCl et 150 mM Imidazole). L'utilisation du vecteur d'expression pCMV β a donc permis la production de protéines avec et sans Tag poly-Histidine.

Les ADNc correspondant à la 12-lipoxygénase ovine ont été insérés dans le plasmide pCMV dans le site de multi-clonage au niveau des sites NotI (voir *Figure 59*). Une amplification de l'ADNc a été effectuée afin d'obtenir un insert comportant la séquence poly-Histidine suivie de celle du facteur Xa puis la séquence du transcrit de la forme normale ou courte de la 12-Lipoxygénase ovine. Les amorces utilisées ont été définies à partir de

Vecteur pET-16b Avec Tag Histidine



Vecteur pCMVβ Avec Tag Histidine

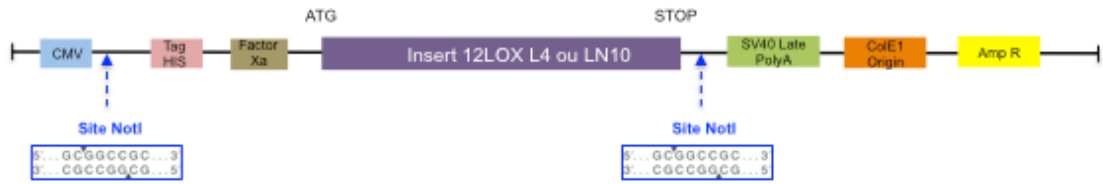


Figure 59 Schémas simplifiés des deux vecteurs *pET-16b* et *pCMVβ* permettant l'obtention de protéines 12-lipoxygénases à queue poly-Histidine

Les constructions pET sont à l'origine de la conception des vecteurs pCMV 12LOX dans le projet. Il semble que l'ATG de la séquence Tag HIS se trouve en compétition avec celui de l'insert (procuré par le site NdeI qui le débute).

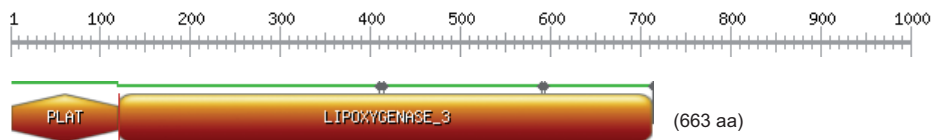
chaque site NotI encadrant l'insert, l'amorce Sens incluant la séquence Tag HIS. La séquence poly-Histidine comporte en amont son propre ATG, celle de l'insert également. L'hypothèse que nous pouvons avancer réside dans la séquence-même de la construction plasmidique utilisée. Il semblerait que le deuxième ATG (celui correspondant à l'ADNc codant pour la 12-lipoxygénase) soit préférentiellement mobilisé, le premier ATG (séquence poly-HISTIDINE en amont) restant secondaire. Cela pourrait donc expliquer l'obtention d'un mélange de protéines taguées et non taguées Histidine par les mêmes cellules COS-7 transfectées. Une compétition s'opère quant au cadre de lecture choisie par la cellule transfectée pour la production d'une version de protéine recombinante. L'amplification de chaque ADNc avec une amorce oligonucléotidique comportant un site de restriction NdeI (CA↓TATG) en utilisant l'ATG de l'amplicon 12LOX n'a probablement pas été le meilleur choix. Le MCS du vecteur pET-16b pour procaryote comportant deux autres sites (XhoI C↓TCGAG et BamHI G↓GATCC), Il aurait été plus judicieux de choisir l'un d'entre eux. De cette manière, en omettant l'ATG de l'ADNc, remplacé par le site de restriction choisi, chaque construction plasmidique avec séquence HIS Tag n'aurait comporté que l'ATG de cette dernière.

Un autre point important soulevé par les expérimentations de surexpression des protéines 12-lipoxygénase ovine menées au laboratoire réside dans l'impossibilité de pouvoir séparer totalement les protéines produites des membranes cellulaires (en vecteur eucaryote pCMV comme en vecteur procaryote pET-16b). Il est à noter que le transcrite de la 12-lipoxygénase humaine de type plaquettaire et de la 12-Lipoxygénase porcine de type leucocytaire ont été clonés et surexprimés en vecteur procaryote *pBluescript* sans purification, les activités enzymatiques ayant été évaluées sur des lysats bactériens entiers (Yoshimoto *et al.*, 1990). De même, la 12-lipoxygénase de type plaquettaire humaine a été surexprimée dans *E. coli* (Nakamura *et al.*, 1997) grâce à l'ADNc cloné de *T. Yoshimoto* prévu en vecteur permettant l'ajout d'un Tag Histidine en partie N-terminale de la protéine. Cette dernière a été purifiée par une technique de fractionnement au sulfate d'ammonium puis adsorbée et éluée *via* une résine Ni²⁺-NTA en colonne.

Lors de cette étude, nous avons observé que la majorité des protéines recombinantes reste dans les culots d'extraction, malgré l'usage de détergents divers, de protéase spécifique de la paroi bactérienne (Lysozyme) ou d'un agent dénaturant puissant (urée). Peu de protéines recombinantes se retrouvent en phase aqueuse sous forme soluble. Les lipoxygénases sont peu décrites structurellement dans les banques de données. Néanmoins, un domaine est très conservé d'une LOX à l'autre : le domaine PLAT/LH2 (*polycystin-1, lipoxygénase and alpha toxin, Lipoxygénase homology 2 (beta barrel) domain*). Ce domaine engendre, pour la protéine qui le contient, la mise en place d'une structure en tonneau munie de feuillets β (voir *Figure 60*).

C'est un domaine présent dans bon nombre de protéines intervenant dans divers voies de métabolisme lipidique (acide arachidonique, glycérolipides, acide linoléique, acide α -linoléique...). Le domaine PLAT est également retrouvé dans les lipases (pour exemple, dans la lipase pancréatique, le domaine PLAT est impliqué dans la fixation à la procolipase), ce qui permet de rapprocher le site actif de la lipase de son substrat d'après (Bateman *et al.* 1999). Pour exemple, la 15-lipoxygénase de mammifère est une protéine composée d'un domaine en sandwich β à son extrémité N-terminale (domaine PLAT) et sa partie C-terminale comporte le domaine catalytique (Gillmor *et al.* 1997). Il est suggéré que le domaine PLAT puisse permettre la localisation de l'enzyme près de la membrane cellulaire, par des liaisons protéine-protéine ou protéine-lipide. PLAT est impliqué dans ces liaisons. Il semble que ce domaine soit lié aux membranes cellulaires, ce qui expliquerait la difficulté de pouvoir solubiliser une majorité des protéines recombinantes produites dans notre cas.

De plus, selon (Palmieri-Thiers 2008), des études de spectroscopie réalisées sur la LOX1 de soja en présence de calcium, ont pu mettre en évidence deux sites de fixation des ions calciques (Tatulian *et al.*, 1998). Il est supposé que le calcium puisse favoriser l'action des Lipoxygénases animales et végétales en permettant la formation de ponts salins entre les



MGRHRILVATGASLFAGSHNRVQLWLVGARGETELELQLRPVIRGQKEEFEHEVPGDLGLQFVKLR
 KHHSVDDAWFCDRITVQGGPACEEAAFPYRWVQGDGVLCPEATARLAGNNALDVQRHREKEL
 KERHKIYRWATWKEGLPLTIAAGCEDDLPANMRFHEEKRLDFEWTLKAGALEMVLKRVYTLSSWT
 SLEDFDLIFWGQKSPLAEKVHQRWQDDELFGYQFLNGANPMLLRCTSLPSRLVLPSCMEELRAQL
 ERELQNGSLFEADFDLIPANVIRGKQYLAAPLVMLKMDPSGKLLPMVIQIPPSISPTPL
 FLPSDPPPLAWLLAKTWVRNSDFQLHQLQYHLLNTHLLAEVIAVATMRCLPGLHPVFKLLMPHIRYT
 MEINTRARTQLISDGGIFDKAVSTGGGGHVHLLRRALAQLTYRSLCPLDDLADRHLGTPGALYAC
 DALRLWEITARYVEGIVHLFYHGDDVVKGDPELQAWCREITEVGLRQAQERGFVPSFQSQNLCHF
 LTMCVFTCTAQHGAINQGLDWYAWVNPACTMRMPPPTTKEDVTMATVMGSLPDVRAQLQMAIT
 WHLGRRPDMVPLGHHKEKYFSDPKAKSVLNQFQTDLENLEREITARNEQLDLPYEYLPKPSHIENS
 VTI

PS50095 **PLAT** **PLAT domain profile** :
 2 - 114: score = 25.544

GRHRILVATGASLFAGSHNRVQLWLVGARGETELELQLRP----VRGQKEEFEHEVPGD
 LGPLQFVKLRKHHSVDDAWFCDRITVQGGPACEEAAFPYRWVQGDGVLCPEATAR

Predicted feature:
 DOMAIN 2 114 PLAT

Absent feature:
 DISULFID 95 111

PS51393 **LIPOXYGENASE_3** **Lipoxygenase iron-binding catalytic domain profile** :
 114 - 663: score = 213.930

RLAGNNALDVQRHREKELKERH-----KIYRWATWKEGLPLTIAAGCEDD---
 -----LPANMRFHEEKRLDFEWTLKAGALEMVL
 KRVYTLSS--WTSLEDFDLIFWGQKSPLAE---KVHQ-----R
 WQDDELFGYQFLNGANPMLLRCTSLPSR-----LVLPSCMEELRAQL----ER
 ELQNGSLFEADFDLIPANVIRG-EKQYLAAPLVMLKMDPSGKLLPMVIQI-QPPS-P
 ISPTPLFLPSD---PPLAWLLAKTWVRNSDFQLHQLQYHLLNTHLLAEVIAVATMRCLP
 GLHPVFKLLMPHIRYTMEINTRARTQLISDGGIFDKAVSTGGGGHVHLLRRALAQLTYRS
 LCPLDDLADRHL---LGT-----PGALYACDALRLWEITARYVEGIVHLFYHGDDVVK
 GDPELQAWCREITEVGLRQAQERGFVPSFQSQNLCHF LTMCVFTCTAQHGAINQGLDW
 YAWVNPACTMR--MPPPTTKEDVTMAT----VMGSLPDVRAQLQMAITWHLGRRPDM
 MVPLGHHKEKY-FSDPKAKSVLNQFQTDLENLEREITARNEQLD-----LPYEYLK
 PSH-----IENSVTI

Predicted features:
 DOMAIN 114 663 Lipoxygenase
 METAL 360 Iron; catalytic
 METAL 365 Iron; catalytic
 METAL 540 Iron; catalytic
 METAL 544 Iron; catalytic
 METAL 663 Iron; via carboxylate; catalytic

Figure 60 Représentation schématique de la forme "normale" de la protéine 12-lipoxygénase ovine. Utilisation du logiciel Prosite (via ExPASy) pour la recherche de motifs connus.

Les 663 acides aminés de la séquence peptidique sont répartis sur deux domaines :
 - un petit domaine N-terminal PLAT/LH2 (indiqué ici en bleu), intracellulaire d'une centaine d'a.a. Il est connu sous le terme domaine PLAT (*Polycystin-1*, *Lipoxygenase*, *Alpha Toxin*) ou domaine LH2 (*Lipoxygenase Homology*) et intervient dans les liaisons protéine-protéine ou protéine-lipide.
 - un grand domaine catalytique C-terminal Lipoxygénase (indiqué ici en rose) comportant le site actif de l'enzyme.

résidus acides de l'enzyme et les phospholipides membranaires (Hammarberg *et al.*, 1999; Kulkarni *et al.* 2002). Les travaux de (Kilty *et al.*, 1999) mentionnent également l'association d'un variant de la protéine 15-S-Lipoxygénase avec les membranes cellulaires *via* un mécanisme faisant intervenir le calcium.

4.2. Activité biologique des protéines recombinantes

Les tests effectués par détection et dosage du métabolite 12-HETE ont permis de démontrer l'activité enzymatique de la 12-lipoxygénase recombinante de forme normale (LN10). La présence du Tag Histidine (en partie N-Terminale) ne gêne pas l'activité enzymatique de la forme normale par encombrement stérique. Nous pouvons suggérer que le site actif de l'enzyme n'est pas localisé dans cette partie de la protéine.

La forme courte L4 seule n'a pas de capacité de conversion du substrat en 12-HETE. D'après (Auboeuf 2013), "*Les variants d'épissage se distinguent par leur contenu en exons. Les protéines produites à partir des ARNm sont structurellement modulaires, c'est-à-dire qu'elles sont constituées de plusieurs domaines assurant des fonctions particulières, telles la localisation cellulaire des protéines, leur activité enzymatique, leurs interactions avec d'autres protéines... Chacun de ces domaines est codé par un exon ou un petit groupe d'exons. L'inclusion et l'exclusion différentielles d'exons modifient les domaines contenus dans les protéines et influent sur leur localisation, leurs propriétés, leur activité...*". La disparition du dernier exon (exon 14) du transcrit de la 12-lipoxygénase sous sa forme courte suggère que le site actif de l'enzyme pourrait impliquer la zone correspondante, en partie C-Terminale. En modifiant la zone correspondante, la conformation de la protéine de forme courte peut être altérée au niveau de sa structure tertiaire par raccourcissement du domaine Lipoxygénase. Cette modification pourrait alors impacter l'activité enzymatique de la molécule.

En revanche, le test d'activité de conversion par compétition des deux formes de protéines vis-à-vis du substrat engendre une diminution d'activité de la forme normale LN10 avec la présence concomitante de la forme courte L4. Nous pouvons suggérer que la forme courte L4, si celle-ci est présente *in vivo*, puisse jouer un rôle de régulation de l'activité enzymatique de la 12-lipoxygénase. Plusieurs hypothèses sont envisageables :

- Un contrôle de l'activité par mobilisation d'une partie du substrat par la forme courte L4, ce dernier étant alors indisponible en totalité pour la forme normale LN10,
- La protéine L4 a peut-être besoin d'être sous forme dimérisée pour avoir une activité biologique,
- une configuration tridimensionnelle de la forme courte engendrant sa fixation sur la 12-lipoxygénase de forme normale, bloquant en partie le site actif de cette dernière.

Des études supplémentaires pourraient être menées afin de répondre à cette question :

- Une recherche de la protéine courte 12LOX L4 pourrait être menée dans les cellules luminales *ex vivo* par la technique de Western blot en conditions non dénaturantes. Il arrive qu'un anticorps reconnaisse un épitope dont les acides aminés (ou a.a.) ne sont pas contigus. Bien que les a.a. de cet épitope soient séparés dans la séquence primaire, ils sont proches les uns des autres dans la structure tridimensionnelle repliée de la protéine, et l'anticorps utilisé ne pourra reconnaître l'épitope que dans cette configuration, en surface d'une structure protéique repliée. Dans ces circonstances, la technique de Western blot en conditions non dénaturantes se justifie (absence de SDS, pas de chauffage des extraits). Néanmoins, l'anti-peptide L4 a la capacité de détecter la protéine 12LOX L4 recombinante dans des extraits protéiques de cellules COS-7.
- Une expérimentation d'immunoprécipitation à l'aide des anti-peptides mis au point pourrait nous apporter des informations sur le rôle de la protéine de forme courte vis-à-vis de celle de forme normale. Si l'anti-peptide L4 est ajouté dans le mélange de protéines purifiées 12LOX LN10 / 12LOX L4, la protéine LN10 retrouve-t-elle une activité biologique équivalente à celle observée lorsque cette dernière est seule? De plus, l'immunsérum de lapin anti-12LOX L4 ne fonctionne pas en immunohistochimie ni en Western blot sur cellules luminales. Un test

de cet anti-peptide 12LOX L4 en immunoprécipitation devrait être effectué avant de procéder à des expérimentations de compétition.

- Une étude de Cristallographie à partir des 2 protéines recombinantes purifiées serait envisageable afin de comparer les structures déduites de ces dernières et de modéliser la fixation possible de l'une vis-à-vis de l'autre.

De plus, des travaux sur les variants de lipoxygénases humaines, telle la 5-Lipoxygénase (Boudreau *et al.*, 2011) (Ochs *et al.*, 2012), ont permis de mettre en évidence une baisse d'activité de la 5-Lipoxygénase de forme "normale" (type sauvage), comme observé lors de notre étude sur la 12-lipoxygénase ovine et son variant court. En dépit de l'inactivité catalytique des protéines isomères issues de variants alternatifs de la 5-Lipoxygénase, ces protéines modifiées inhibent la capacité de synthèse de la 5-Lipoxygénase de type "normal", suggérant que ces formes alternatives pourraient agir en tant qu'inhibiteurs endogènes, probablement impliqués dans la régulation de la biosynthèse des leucotriènes *in vivo*. La forme courte de 12-lipoxygénase, si elle existe *in vivo*, pourrait de la même manière avoir une telle action vis-à-vis de la forme "normale" de l'enzyme, au regard de son activité inhibitrice mise en évidence lors du test d'activité biologique effectué sur extraits totaux de cellules transfectées et sur protéines recombinantes purifiées. Les mécanismes par lesquels l'effet inhibiteur de l'isoforme alternative de la 12-lipoxygénase se produit et la modulation de l'expression de cette isoforme au cours de la période péri-implantatoire nécessitent de plus larges investigations.

Le rôle de la 12-lipoxygénase dans l'utérus de brebis n'est toujours pas élucidé à ce jour. La deuxième voie de conversion de l'acide arachidonique est celle des cyclooxygénés *via* les cyclooxygénases 1 & 2. Les métabolites issus de l'activité de ces enzymes, les prostaglandines, jouent un rôle primordial dans l'utérus. La justification de l'existence d'un système tel celui de la voie de la 12-lipoxygénase pourrait résider dans la nécessité d'une régulation de l'utilisation de l'acide arachidonique. La balance existant entre la voie des cyclooxygénases et celle des lipoxygénases doit aboutir à un équilibre afin que l'utérus ne produise pas trop de métabolites bioactifs de chacune de ces voies.

Pour exemple, lors d'une étude menée chez l'homme concernant l'exposition de la peau au rayonnement UV (Pilkington *et al.*, 2015), il a été montré que l'inhibition de la voie COX-2 réduit la production du vasodilatateur PGE2 mais augmente la quantité de 12-HETE. Cela illustre l'équilibre existant entre ces voies de métabolisme de l'acide arachidonique. Le 12-HETE, dans ce cas, facilite l'infiltration leucocytaire par son rôle chimiotactique, entraînant l'inflammation cutanée.

Ce n'est donc pas tant l'existence de la 12-lipoxygénase dans l'utérus mais plutôt le rôle de son métabolite, le 12-HETE, qu'il serait intéressant d'élucider dans des situations physiologiques telles le cycle œstral ou encore la gestation.

E/ Annexe

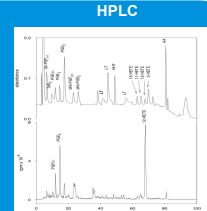
Poster "ICAR"
18th International Congress on Animal Reproduction,
Tours (France), 26 au 30 juin 2016



DUBOIS Olivier*, REINAUD Pierrette, BOULANGER Laurent, SANDRA Olivier, JOLIVET Geneviève, CHARPIGNY Gilles*
UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France * Contacts : olivier.dubois@jouy.inra.fr, gilles.charpigny@jouy.inra.fr

Introduction

A better understanding of reproduction of domestic animals relies in a good knowledge of molecular traffic between maternal uterine tissues and conceptus. Complex molecules are involved in the embryo-maternal interaction, among which proteins, lipids, play an important role for implantation and embryo development. In some species lipid mediators from lysophospholipids family or from eicosanoids, have been reported to be involved in these biological processes. In ruminant as in other species, endometrium synthesizes numerous cyclooxygenase metabolites derived from arachidonic acid (AA), a polyunsaturated fatty acid released from cell membrane phospholipids. However, AA could also be metabolized through P450 epoxygenases and lipoxygenases (LOX) pathways. Previous experiment in our lab showed that ovine endometrium released important amounts of 12-S-HETE (see HPLC data on right) suggesting the implication of the 12-S-Lipoxygenase. The role of this enzyme in female reproductive tract is still misunderstood whereas it was clearly described in cell proliferation and pathologies such as cancer.



12-S-HETE is a major arachidonic acid end product synthesised by ovine endometrium

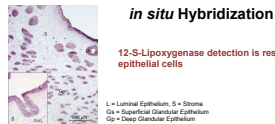
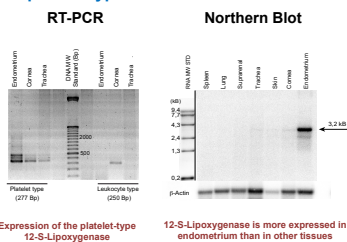
The aims of our work were to :

- Determine the ability of the ovine uterus to produce AA lipoxygenase metabolites,
- Examine the expression of the enzyme at mRNA level,
- Analyze 12-Lipoxygenase gene regulation during oestrous cycle and early gestation.

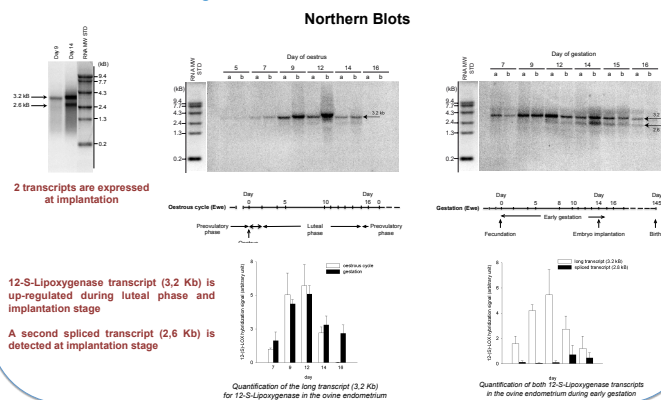
Material, Methods and Results

Luminal epithelial cells of time-dated pregnant and cyclic ewes were recovered from excised endometrium. Luminal cells were used for enzymatic tests and RNA extraction was done for others and different ovine tissues. Cryosections (5µm) of endometrium were generated to localize 12-S-Lipoxygenase transcript using *in situ* hybridization procedure.

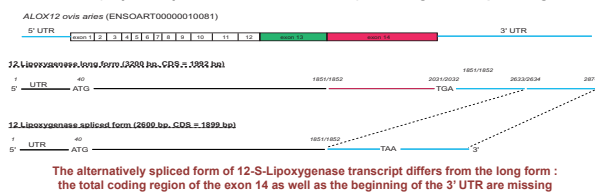
Evidence of a 12-S-Lipoxygenase mRNA of platelet type in the ovine endometrium



12-S-Lipoxygenase transcript is expressed during oestrous cycle and early gestation in the ovine endometrium



Identification of full length transcripts encoding ovine 12-S-Lipoxygenase RACE (Rapid Amplification of cDNAs Ends), Cloning and Sequencing



Nucleotide identity of ovine endometrial 12-S-Lipoxygenase long form compared with available bovine lipoxygenases sequences

Gene Name	Accession Number (Bos taurus)	Type	Tissue	Identity (Ovis aries/ Bos taurus)
ALOX12	NM_001192336	12S-type, platelet type	Cornea	97%
ALOX12B	NM_001192038	12R-type	Lung	ND
ALOX12E	NM_001083532	epidermal	Skin	68%
ALOX15 (ALOX12/15)	NM_174501	leukocyte type	Trachea	71%

Conclusion and Perspectives

We have demonstrated for the first time that ovine endometrium express high level of mRNA of the platelet type 12-S-Lipoxygenase. We characterized a full length mRNA corresponding to the ALOX12 gene and an alternatively spliced form.

Next experiments will require to look for the corresponding proteins by producing anti-peptides directed against specific antigenic determinants. Plasmid constructions will allow us to obtain recombinant proteins for answering two major questions :

- The biological activity of the observed alternative spliced variant,
- The role of the 12-S-Lipoxygenase pathway in embryo development and implantation.

F/ Références bibliographiques

- Ackermann, J. A., K. Hofheinz, M. M. Zaiss and G. Kronke (2016). "The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity." Biochimica et biophysica acta.
- Auboeuf (2013). "Un gène, combien de protéines ? ." Pour la science **81**.
- Baranov, P. V., R. F. Gesteland and J. F. Atkins (2002). "Recoding: translational bifurcations in gene expression." Gene **286**(2): 187-201.
- Bateman, A. and R. Sandford (1999). "The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle." Current biology : CB **9**(16): R588-590.
- Berger, M., K. Schwarz, H. Thiele, I. Reimann, A. Huth, S. Borngraber, H. Kuhn and B. J. Thiele (1998). "Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits." Journal of Molecular Biology **278**(5): 935-948.
- Bhowmick, R., N. H. Tin Maung, B. P. Hurley, E. B. Ghanem, K. Gronert, B. A. McCormick and J. M. Leong (2013). "Systemic Disease during Streptococcus pneumoniae Acute Lung Infection Requires 12-Lipoxygenase-Dependent Inflammation." The Journal of Immunology **191**(10): 5115-5123.
- Borngräber, S., R. J. Kuban, M. Anton and H. Kuhn (1996). "Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases." Journal of Molecular Biology **264**(5): 1145-1153.
- Boudreau, L. H., J. Bertin, P. P. Robichaud, M. Laflamme, R. J. Ouellette, N. Flamand and M. E. Surette (2011). "Novel 5-lipoxygenase isoforms affect the biosynthesis of 5-lipoxygenase products." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **25**(3): 1097-1105.
- Boukhliq, R. (2002). "Cours en ligne sur la reproduction ovine : Partie 2 - Physiologie de la reproduction."
- Brash, A. R., W. E. Boeglin and M. S. Chang (1997). "Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(12): 6148-6152.
- Buelna-Chontal, M. and C. Zazueta (2013). "Redox activation of Nrf2 & NF-κB: A double end sword?" Cellular Signalling **25**(12): 2548-2557.
- Calder (2005). "Polyunsaturated fatty acids and inflammation." Biochemical Society Transactions **33**: 423-427.
- Castonguay, F. (2012). "La reproduction chez les ovins."
- Chandrasekharan, J. A., A. Marginean and N. Sharma-Walia (2016). "An insight into the role of arachidonic acid derived lipid mediators in virus associated pathogenesis and malignancies." Prostaglandins & Other Lipid Mediators.
- Chang, W. C., J. Nakao, H. Orimo and S. Murota (1982). "Effects of reduced glutathione on the 12-lipoxygenase pathways in rat platelets." The Biochemical journal **202**(3): 771-776.
- Charpigny, G., P. Reinaud, C. Creminon and J. P. Tamby (1999). "Correlation of increased concentration of ovine endometrial cyclooxygenase 2 with the increase in PGE2 and PGD2 in the late luteal phase." Journal of reproduction and Fertility **117**(2): 315-324.
- Charpigny, G., P. Reinaud, J. P. Tamby, C. Creminon and M. Guillomot (1997a). "Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period." Biology of Reproduction **57**(5): 1032-1040.
- Charpigny, G., P. Reinaud, J. P. Tamby, C. Creminon, J. Martal, J. Maclouf and M. Guillomot (1997b). "Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy." Endocrinology **138**(5): 2163-2171.
- Chen, X. S., U. Kurre, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and C. D. Funk (1994). "cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases." The Journal of biological chemistry **269**(19): 13979-13987.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.
- De Marzo, N., D. L. Sloane, S. Dicharry, E. Highland and E. Sigal (1992). "Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase." The American journal of physiology **263**(1 Pt 1): 1 p preceding L1.
- Dobrian, A. D., D. C. Lieb, B. K. Cole, D. A. Taylor-Fishwick, S. K. Chakrabarti and J. L. Nadler (2011). "Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases." Progress in Lipid Research **50**(1): 115-131.
- Driancourt, M. A., R. Webb and R. C. Fry (1991). "Does follicular dominance occur in ewes?" Journal of reproduction and Fertility **93**(1): 63-70.

- Dumoulin, D. (2004). "Pathologies utérines chez la vache depuis les oviductes jusqu'au col." Thèse vétérinaire ENV Lyon.
- Fennell, L. M. and J. V. Fleming (2014). "Differential processing of mammalian L-histidine decarboxylase enzymes." Biochemical and Biophysical Research Communications **445**(2): 304-309.
- Ferrandiz, M. L., A. G. Ramachandran Nair and M. J. Alcaraz (1990). "Effect of flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs on arachidonate metabolism in rat peritoneal leukocytes." Die Pharmazie **45**(6): 444-445.
- Flatman, S., J. S. Hurst, R. G. McDonald-Gibson, G. E. Jonas and T. F. Slater (1986). "Biochemical studies on a 12-lipoxygenase in human uterine cervix." Biochim Biophys Acta **883**(1): 7-14.
- Fontaine (2009). "Classification d'ARN codants et d'ARN non-codants."
- Forde, N., G. B. Duffy, P. A. McGettigan, J. A. Browne, J. P. Mehta, A. K. Kelly, N. Mansouri-Attia, O. Sandra, B. J. Loftus, M. A. Crowe, T. Fair, J. F. Roche, P. Lonergan and A. C. Evans (2012). "Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: both dependent upon and independent of interferon tau." Physiological Genomics **44**(16): 799-810.
- Gillmor, S. A., A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal and M. F. Browner (1997). "The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity." Nature structural biology **4**(12): 1003-1009.
- Hada, T., H. Hagiya, H. Suzuki, T. Arakawa, M. Nakamura, S. Matsuda, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, T. Azekawa, Y. Morita and et al. (1994). "Arachidonate 12-lipoxygenase of rat pineal glands: catalytic properties and primary structure deduced from its cDNA." Biochimica et biophysica acta **1211**(2): 221-228.
- Hagmann, W., X. Gao, A. Zacharek, L. A. Wojciechowski and K. V. Honn (1995). "12-Lipoxygenase in Lewis lung carcinoma cells: molecular identity, intracellular distribution of activity and protein, and Ca(2+)-dependent translocation from cytosol to membranes." Prostaglandins **49**(1): 49-62.
- Hamberg, M. and B. Samuelsson (1974). "Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **71**(9): 3400-3404.
- Hammarberg, T. and O. Radmark (1999). "5-lipoxygenase binds calcium." Biochemistry **38**(14): 4441-4447.
- Hansbrough, J. R., Y. Takahashi, N. Ueda, S. Yamamoto and M. J. Holtzman (1990). "Identification of a novel arachidonate 12-lipoxygenase in bovine tracheal epithelial cells distinct from leukocyte and platelet forms of the enzyme." The Journal of biological chemistry **265**(3): 1771-1776.
- Hartmann, C., F. N. Corre-Menguy, A. Boualem, M. Jovanovic and C. Lelandais-Briere (2004). "[MicroRNAs: a new class of gene expression regulators]." Medecine sciences : M/S **20**(10): 894-898.
- Hecker, M., A. Hatzelmann and V. Ullrich (1987). "Preparative HPLC purification of prostaglandin endoperoxides and isolation of novel cyclooxygenase-derived arachidonic acid metabolites." Biochemical pharmacology **36**(6): 851-855.
- Hemak, J., D. Gale and T. G. Brock (2002). "Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme." Journal of molecular modeling **8**(4): 102-112.
- Ho, P. P. K., P. Walters and H. R. Sullivan (1977). "A particulate arachidonate lipoxygenase in human blood platelets." Biochemical and Biophysical Research Communications **76**(2): 398-405.
- Imig, J. D. (2006). "Eicosanoids and renal vascular function in diseases." Clinical Science **111**(1): 21-34.
- Interbev (2015). "L'essentiel de la filière viande ovine française 2015."
- Issan, Y., E. Hochhauser, A. Guo, K. H. Gotlinger, R. Kornowski, D. Leshem-Lev, E. Lev, E. Porat, E. Snir, C. I. Thompson, N. G. Abraham and M. Laniado-Schwartzman (2013). "Elevated level of pro-inflammatory eicosanoids and EPC dysfunction in diabetic patients with cardiac ischemia." Prostaglandins & Other Lipid Mediators **100-101**: 15-21.
- Ivanov, I., D. Heydeck, K. Hofheinz, J. Roffeis, V. B. O'Donnell, H. Kuhn and M. Walther (2010). "Molecular enzymology of lipoxygenases." Archives of Biochemistry and Biophysics **503**(2): 161-174.
- Iwamuro, S., M. Saeki and S. Kato (1999). "Multi-ubiquitination of a nascent membrane protein produced in a rabbit reticulocyte lysate." Journal of biochemistry **126**(1): 48-53.
- Izumi, T., S. Hoshiko, O. Radmark and B. Samuelsson (1990). "Cloning of the cDNA for human 12-lipoxygenase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(19): 7477-7481.

- Jisaka, M., R. B. Kim, W. E. Boeglin, L. B. Nanney and A. R. Brash (1997). "Molecular cloning and functional expression of a phorbol ester-inducible 8S-lipoxygenase from mouse skin." The Journal of biological chemistry **272**(39): 24410-24416.
- Kawajiri, H., D. Zhuang, N. Qiao, T. Yoshimoto, M. Yamamoto, S. Iseki and K. Hamaguchi (2000). "Expression of arachidonate 12-lipoxygenase in rat tissues: a possible role in glucagon secretion." The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society **48**(10): 1411-1419.
- Kilty, I., A. Logan and P. J. Vickers (1999). "Differential characteristics of human 15-lipoxygenase isozymes and a novel splice variant of 15S-lipoxygenase." European journal of biochemistry / FEBS **266**(1): 83-93.
- Korzekwa, A. J., M. M. Bah, A. Kurzynowski, K. Lukasik, A. Groblewska and D. J. Skarzynski (2010). "Leukotrienes modulate secretion of progesterone and prostaglandins during the estrous cycle and early pregnancy in cattle: an in vivo study." Reproduction **140**(5): 767-776.
- Krieg, P. and G. Furstenberger (2014). "The role of lipoxygenases in epidermis." Biochimica et biophysica acta **1841**(3): 390-400.
- Krieg, P., S. Rosenberger, S. de Juanes, S. Latzko, J. Hou, A. Dick, U. Kloz, F. van der Hoeven, I. Hausser, I. Esposito, M. Rauh and H. Schneider (2013). "Alox3 Knockout Mice Reveal a Function of Epidermal Lipoxygenase-3 as Hepoxilin Synthase and Its Pivotal Role in Barrier Formation." Journal of Investigative Dermatology **133**(1): 172-180.
- Kuhn, H., S. Banthiya and K. van Leyen (2015). "Mammalian lipoxygenases and their biological relevance." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1851**(4): 308-330.
- Kulkarni, S., S. Das, C. D. Funk, D. Murray and W. Cho (2002). "Molecular Basis of the Specific Subcellular Localization of the C2-like Domain of 5-Lipoxygenase." Journal of Biological Chemistry **277**(15): 13167-13174.
- Lagarde, M., M. Croset, K. S. Authi and N. Crawford (1984). "Subcellular localization and some properties of lipoxygenase activity in human blood platelets." The Biochemical journal **222**(2): 495-500.
- Leveziel, H. and E. P. Crihiu (2000). "Etat des lieux de la cartographie du génome des ruminants." INRA Productions Animales: 103-107.
- Li, Q., Y. P. Cheon, A. Kannan, S. Shanker, I. C. Bagchi and M. K. Bagchi (2004). "A novel pathway involving progesterone receptor, 12/15-lipoxygenase-derived eicosanoids, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates implantation in mice." The Journal of biological chemistry **279**(12): 11570-11581.
- Liminga, M. and E. Oliw (1999). "cDNA cloning of 15-lipoxygenase type 2 and 12-lipoxygenases of bovine corneal epithelium." Biochimica et biophysica acta **1437**(2): 124-135.
- Lutz, C. S. and A. L. Cornett (2013). "Regulation of genes in the arachidonic acid metabolic pathway by RNA processing and RNA-mediated mechanisms." Wiley interdisciplinary reviews. RNA **4**(5): 593-605.
- Ma, K., C. S. Nunemaker, R. Wu, S. K. Chakrabarti, D. A. Taylor-Fishwick and J. L. Nadler (2010). "12-Lipoxygenase Products Reduce Insulin Secretion and β -Cell Viability in Human Islets." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **95**(2): 887-893.
- Marventano, S., P. Kolacz, S. Castellano, F. Galvano, S. Buscemi, A. Mistretta and G. Grosso (2015). "A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter?" International journal of food sciences and nutrition **66**(6): 611-622.
- Matoulkova, E., E. Michalova, B. Vojtesek and R. Hrstka (2014). "The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells." RNA Biology **9**(5): 563-576.
- Mikule, K., J. C. Gatlin, B. A. de la Houssaye and K. H. Pfenninger (2002). "Growth cone collapse induced by semaphorin 3A requires 12/15-lipoxygenase." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **22**(12): 4932-4941.
- Nakamura, M., N. Ueda, S. Yamamoto, K. Ishimura, N. Uchida and S. Arase (1997). "Tissue distribution and subcellular localization of platelet-type arachidonate 12-lipoxygenase." Advances in experimental medicine and biology **407**: 15-20.
- Nishiyama, M., H. Okamoto, T. Watanabe, T. Hori, T. Hada, N. Ueda, S. Yamamoto, H. Tsukamoto, K. Watanabe and T. Kirino (1992). "Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in canine brain tissues." Journal of Neurochemistry **58**(4): 1395-1400.

- Ochs, M. J., B. L. Sorg, L. Pufahl, M. Grez, B. Suess and D. Steinhilber (2012). "Post-transcriptional regulation of 5-lipoxygenase mRNA expression via alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay." *PloS one* **7**(2): e31363.
- Palmieri-Thiers, C. (2008). "Expression et caractérisation de la lipoxigénase recombinante d'olive : une enzyme présentant une double spécificité d'hydroperoxydation et exprimée dans les derniers stades de développement des fruits."
- Pellicer-Rubio, M. T., S. Ferchaud, S. Freret, H. Tournadre, A. Fatet, S. Boulot, J. Pavie, B. Leboeuf and F. Bocquier (2009). "Les méthodes de maîtrise de la reproduction disponibles chez les mammifères d'élevage et leur intérêt en agriculture biologique." *INRA Productions Animales* **22**(3): 255-270.
- Peterson, A. J., H. R. Tervit, R. J. Fairclough, P. G. Havik and J. F. Smith (1976). "Jugular levels of 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F and progesterone around luteolysis and early pregnancy in the ewe." *Prostaglandins* **12**(4): 551-558.
- Pilkington, S. M., S. A. Murphy, S. Kudva, A. Nicolaou and L. E. Rhodes (2015). "COX inhibition reduces vasodilator PGE2 but is shown to increase levels of chemoattractant 12-HETE in vivo in human sunburn." *Experimental dermatology* **24**(10): 790-791.
- Ribeiro, E. S., J. E. Santos and W. W. Thatcher (2016). "Role of lipids on elongation of the preimplantation conceptus in ruminants." *Reproduction* **152**(4): R115-126.
- Samaan, S., E. Dardenne, D. Auboeuf and C. Bourgeois (2015). "L'épissage alternatif : un gène, combien de protéines ?" *Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL, UMR Inserm 1052 CNRS 5286 - Centre Léon Bérard)*.
- Satterfield, M. C., F. W. Bazer and T. E. Spencer (2006). "Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus." *Biology of Reproduction* **75**(2): 289-296.
- Schewe, T., W. Halangk, C. Hiebsch and S. Rapoport (1977). "Degradation of mitochondria by cytosolic factors in reticulocytes." *Acta biologica et medica Germanica* **36**(3-4): 363-372.
- Shannon, V. R., E. C. Crouch, Y. Takahashi, N. Ueda, S. Yamamoto and M. J. Holtzman (1991). "Related expression of arachidonate 12- and 15-lipoxygenases in animal and human lung tissue." *The American journal of physiology* **261**(6 Pt 1): L399-405.
- Shields, D. and G. Blobel (1978). "Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes." *The Journal of biological chemistry* **253**(11): 3753-3756.
- Shornick, L. P. and M. J. Holtzman (1993). "A cryptic, microsomal-type arachidonate 12-lipoxygenase is tonically inactivated by oxidation-reduction conditions in cultured epithelial cells." *The Journal of biological chemistry* **268**(1): 371-376.
- Siegel, M. I., R. T. McConnell, N. A. Porter and P. Cuatrecasas (1980). "Arachidonate metabolism via lipoxygenase and 12L-hydroperoxy-5,8,10,14-icosatetraenoic acid peroxidase sensitive to anti-inflammatory drugs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**(1): 308-312.
- Sloane, D. L., R. Leung, C. S. Craik and E. Sigal (1991). "A primary determinant for lipoxygenase positional specificity." *Nature* **354**(6349): 149-152.
- Smith, G. C., W. X. Wu and P. W. Nathanielsz (2001). "Lipoxygenase gene expression in baboon intrauterine tissues in late pregnancy and parturition." *Molecular Human Reproduction* **7**(6): 587-594.
- Soumya, S. J., S. Binu, A. Helen, P. Reddanna and P. R. Sudhakaran (2013). "15(S)-HETE-induced angiogenesis in adipose tissue is mediated through activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway." *Biochemistry and Cell Biology* **91**(6): 498-505.
- Spencer, T. E., N. Forde and P. Lonergan (2016). "The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants." *Journal of dairy science* **99**(7): 5941-5950.
- Spencer, T. E., O. Sandra and E. Wolf (2008). "Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches." *Reproduction* **135**(2): 165-179.
- Takahashi, Y., G. R. Reddy, N. Ueda, S. Yamamoto and S. Arase (1993). "Arachidonate 12-lipoxygenase of platelet-type in human epidermal cells." *The Journal of biological chemistry* **268**(22): 16443-16448.
- Tatulian, S. A., J. Steczko and W. Minor (1998). "Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1." *Biochemistry* **37**(44): 15481-15490.

- Ueda, N., A. Hiroshima, K. Natsui, F. Shinjo, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, K. Ii, K. Gerozissis and F. Dray (1990). "Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in parenchymal cells of porcine anterior pituitary." The Journal of biological chemistry **265**(4): 2311-2316.
- Watanabe, T., J. F. Medina, J. Z. Haeggstrom, O. Radmark and B. Samuelsson (1993). "Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain." European journal of biochemistry / FEBS **212**(2): 605-612.
- Woclawek-Potocka, I., P. Rawinska, I. Kowalczyk-Zieba, D. Boruszewska, E. Sinderewicz, T. Wasniewski and D. J. Skarzynski (2014). "Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in human and ruminant reproductive tract." Mediators of inflammation **2014**: 649702.
- Yokoyama, C., K. Mizuno, H. Mitachi, T. Yoshimoto, S. Yamamoto and C. R. Pace-Asciak (1983). "Partial purification and characterization of arachidonate 12-lipoxygenase from rat lung." Biochimica et biophysica acta **750**(2): 237-243.
- Yoshimoto, T., Y. Yamamoto, T. Arakawa, H. Suzuki, S. Yamamoto, C. Yokoyama, T. Tanabe and H. Toh (1990). "Molecular cloning and expression of human arachidonate 12-lipoxygenase." Biochemical and Biophysical Research Communications **172**(3): 1230-1235.
- Zarco, L., G. H. Stabenfeldt, J. F. Quirke, H. Kindahl and G. E. Bradford (1988). "Release of prostaglandin F-2 alpha and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths." Journal of reproduction and Fertility **83**(2): 517-526.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la vie et de la terre

**CARACTERISATION DE LA 12-S-LIPOXYGENASE DANS L'ENDOMETRE OVIN
PENDANT LA GESTATION PRECOCE
MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE DE DEUX TRANSCRITS**

Olivier DUBOIS

Une meilleure compréhension de la reproduction des animaux domestiques dépend d'une bonne connaissance du trafic moléculaire existant entre les tissus maternels utérins et le conceptus. Des molécules complexes sont impliquées dans les interactions embryo-maternelles, parmi lesquelles des protéines et des médiateurs lipidiques jouent un rôle important pour l'implantation et le développement de l'embryon. Chez certaines espèces, des médiateurs lipidiques dérivés des lysophospholipides et des éicosanoïdes ont été décrits comme acteurs impliqués dans ces processus biologiques. Chez les ruminants, l'endomètre synthétise de nombreux métabolites cyclooxygénés dérivés de l'acide arachidonique (AA), un acide gras polyinsaturé, issus des phospholipides membranaires de la cellule. L'AA peut également suivre d'autres voies métaboliques telles celle des Epoxygénases P450 ou encore celle des Lipoxygénases (LOX). Les travaux préliminaires au sein de notre laboratoire ont montré que l'endomètre ovin produit de grandes quantités de 12-S-HETE, suggérant l'implication de la 12-S-Lipoxygénase. Le rôle de cet enzyme dans le tractus reproducteur femelle est encore incompris alors qu'il a été clairement décrit dans des processus de prolifération cellulaire et des pathologies telles le cancer. L'objectif de ce travail a été de déterminer la capacité de l'utérus de brebis à produire des métabolites lipoxygénés, examiner l'expression de cet enzyme au niveau des transcrits et analyser la régulation génique de la 12-S-Lipoxygénase pendant le cycle oestral et en début de gestation. Nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, la capacité de l'endomètre à produire une grande quantité de transcrits spécifiques de la 12-S-Lipoxygénase de type plaquettaire. Nous avons caractérisé un ARNm correspondant au gène *ALOX12* ainsi qu'une forme issue d'épissage alternatif, au dernier exon manquant. Ce variant n'est exprimé qu'au cours de l'élongation et pendant l'implantation du conceptus alors que le transcrit correspondant à la forme "normale" est présent pendant toute la durée du cycle oestral et sur toute la période péri-implantatoire. Le clonage en vecteurs d'expression eucaryote pCMV β et la transfection en lignée de cellules COS-7 a permis la production des protéines correspondantes *in vitro*. L'activité biologique de ces deux protéines a été évaluée par un test de conversion de l'AA en 12-S-HETE, mesuré par HPLC. L'activité biologique de la protéine correspondant à la forme épissée du transcrit reste inexistante par comparaison à la forme "normale". En revanche, le test d'activité réalisé en présence des deux protéines recombinantes, par compétition vis-à-vis du substrat, révèle une diminution de l'activité de la 12-S-Lipoxygénase de forme "normale", suggérant un possible rôle régulateur de la forme courte sur la forme "normale". La cinétique d'expression de la protéine 12-S-Lipoxygénase dans l'endomètre a été évaluée sur les mêmes périodes d'étude grâce à l'utilisation d'un anti-peptide, spécifique de chaque forme, fabriqué au laboratoire. L'anti-peptide correspondant à la forme courte n'a pas permis la détection de celle-ci au sein de l'utérus. Cette forme existe-t-elle réellement *in vivo*? Des investigations supplémentaires restent à poursuivre pour sa mise en évidence et le rôle de la 12-S-Lipoxygénase quant au développement et l'implantation de l'embryon chez la brebis.

Mots clés : Brebis, 12-S-Lipoxygénase, 12-S-HETE, gestation, cycle oestral, Endomètre, Epissage, Activité enzymatique.