

## **Impact du conceptus sur le transcriptome de l'endomètre bovin à l'implantation**

SANDRA O. (1, 8), MANSOURI N. (1), AUBERT J. (2), REINAUD P. (1), GIRAUD-DELVILLE C. (1), GALIO L. (3), DEGRELLE S. (1), HUE I. (1), HEYMAN Y. (1), EVERTS R. (4), RICHARD C. (5), KRAUSS D. (6), YANG J. (7), LEWIN HA. (4), RENARD JP. (1)

(1) INRA, UMR 1198 biologie du développement et reproduction - ENVA, UMR 1198 biologie du développement et reproduction, CNRS - FRE 2857 - F-78350 Jouy-en-Josas - France

(2) UMR AgroParisTech / INRA 518 - 16, rue Claude Bernard - 75231 Paris Cedex 05

(3) INRA, UR1196-génomique et physiologie de la lactation - Jouy-en-Josas - France

(4) Department of Animal Sciences - University of Illinois at Urbana-Champaign - Urbana - IL - USA

(5) INRA - unité commune d'expérimentation animale de Bressonvilliers - 91630 Leudeville - France

(6) Unité expérimentale de Bourges - Domaine de Galle - 18520 Avord - France

(7) Center for Regenerative Biology/Department of Animal Science, University of Connecticut - Storrs - Connecticut - France

(8) Auteur correspondant : olivier.sandra@jouy.inra.fr

**RESUME** - Chez les bovins, la période péri-implantatoire est une étape critique, associée à l'essentiel des échecs de gestation. L'objectif principal de ce projet vise à identifier des facteurs endométriaux cruciaux lors de l'implantation. A partir d'endomètres bovins (vingt jours de cycle ou de gestation) et de puces bovines de 13300 oligonucléotides, les profils d'expression génique montrent que la gestation affecte le transcriptome endométrial avec un impact majeur sur la croissance et la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire ou le métabolisme. Les niveaux d'expression d'une sélection de gènes ont été confirmés par qRT-PCR, leurs localisations cellulaires analysées par hybridation *in situ*. La régulation directe par l'IFNtau des gènes sélectionnés a été établie à l'aide de cultures primaires endométriales. Nos données peuvent contribuer à identifier de nouveaux facteurs présentant un intérêt potentiel comme marqueurs de la gestation précoce.

## **Impact of the conceptus on the endometrial transcriptome at implantation in cattle**

SANDRA O., MANSOURI N., AUBERT J., REINAUD P., GIRAUD-DELVILLE C., GALIO L., DEGRELLE S., HUE I., HEYMAN Y., EVERTS R., RICHARD C., KRAUSS D., YANG J., LEWIN HA., RENARD JP.

INRA - UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction - ENVA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction - CNRS - FRE 2857 - F-78350 Jouy-en-Josas - France

**SUMMARY** - In cattle, peri-implantation is a critical step associated to the highest rate of pregnancy failures. Our project aims at identifying endometrial factors that play crucial functions at implantation. Using a bovine microarray (13330 oligonucleotides) dedicated to the study of pregnancy, expression profiles of the endometrium were established at day 20 of the oestrous cycle or pregnancy. Pregnancy deeply affects various biological functions in the endometrium including "cell growth and differentiation", "immune response" or "metabolism". Twenty genes were selected and their differential expressions were confirmed by quantitative RT-PCR, their cellular localisations were analysed by *in situ* hybridisation, and the direct regulation by IFNtau was established using primary cultures of bovine endometrial cells. Our data may contribute to identify new genes as potential biological markers for early pregnancy.

## INTRODUCTION

Chez les mammifères, la communication finement régulée entre le *conceptus* (l'embryon et ses annexes) et l'endomètre est nécessaire pour l'établissement et le maintien de la gestation (Paria *et al.*, 2002). Le succès de l'implantation dépend de deux facteurs essentiels. Le premier concerne l'ajustement de l'environnement utérin aux besoins du *conceptus* en développement, contrôlé par des facteurs d'origine maternelle et embryonnaire. Le second porte sur la transformation profonde de l'endomètre nécessaire à l'apposition et à l'adhésion des cellules trophoblastiques sur les cellules endométriales. Chez les ruminants, la structure de l'endomètre est particulière. Deux types de structures endométriales sont nécessaires pour la survie, le développement et l'implantation du *conceptus* : les zones caronculeuses ou caroncules [C] - petites structures aglandulaires, riches en cellules fibroblastiques, réparties sur l'ensemble des cornes utérines qui correspondent aux sites de placentation superficielle par l'association avec les cotylédons d'origine fœtale - séparées par de larges zones intercaronculeuses [IC] contenant les glandes endométriales produisant les sécrétions utérines ou histotrophes. Chez la vache, après fécondation et éclosion, le *conceptus* s'allonge progressivement avant de s'implanter (19-20 jours de gestation), période pendant laquelle on observe un fort taux de pertes embryonnaires (Humblot, 2001). Cette période péri-implantatoire est associée à la sécrétion d'un facteur d'origine strictement trophoctodermique, l'interféron-tau (IFN $\tau$ ). Cet interféron de type I est spécifique des ruminants et au-delà de son activité immunosuppressive, il assure le maintien de la production lutéale de progestérone par des actions antilutéolytiques médiées par l'endomètre (Martal *et al.*, 1997). Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'implantation, notre travail vise à analyser l'impact de la gestation sur la physiologie endométriale chez la vache en tenant compte des différences morphologiques et en nous appuyant sur la disponibilité d'une puce bovine non commerciale de 13 300 oligonucléotides dédiée à la reproduction (réseau 13K). Nous avons pu mettre en évidence la régulation de familles de gènes en fonction de la zone endométriale analysée et, pour une sélection de gènes, nous avons confirmé la régulation différentielle par PCR en temps réel et déterminé la régulation par l'IFN $\tau$  *in vitro*.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. ANIMAUX

Le cycle œstrien des vaches charolaises ou de génisses holstein-normandes a été synchronisé par la méthode Crestar. Les animaux ont ensuite été ou non inséminés artificiellement puis tous abattus au 20<sup>ème</sup> jour *post-oestrus*. Pour tous les animaux, la cavité utérine a été perfusée (PBS) et, pour les vaches gravides, le stade de développement du *conceptus* a été confirmé. L'endomètre de la corne ipsilatérale au corps jaune a été disséqué en séparant minutieusement les zones [C] des zones [IC] puis le tissu a été immédiatement congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C.

### 1.2. HYBRIDATION DES ECHANTILLONS AVEC LE RESEAU 13K

Chaque lame de verre du réseau 13K contient 13 257 oligonucléotides longs (70-mer) correspondant à ~12 000

gènes uniques (NCBI GEO : GPL2853, Everts *et al.*, 2008). Les hybridations ont été réalisées avec neuf animaux cycliques et cinq en gestation pour l'analyse [C vs IC] et neuf animaux en cycle vs. neuf animaux en gestation pour l'analyse des zones [C] ou [IC].

Les ARNs totaux (ARNt) de chaque échantillon ont été extraits avec du Trizol (Invitrogen) puis traités par la DNase (*RNeasy*, Qiagen) pour éliminer l'ADN génomique résiduel. La qualité et l'intégrité des ARN ont été analysées à l'aide d'un *BioANalyser 2100* (Agilent) et la quantification réalisée par spectrophotométrie (*Nanodrop*, Thermo Scientific). Vingt microgrammes d'ARNt ont été rétrotranscrits en présence d'oligo dT et de dUTP-Amino-Allyl, purifiés puis marqués avec un fluorochrome NHS-ester Cy3 ou Cy5 (Amersham). Les échantillons ont été hybridés manuellement avec les lames 13K à l'aide du kit Pronto<sup>TM</sup> (Corning, Fischer Scientific Bioblock) pendant 16 à 18 h. Les lames ont été lavées en conditions stringentes, lues avec un scanner GenePix 4000B puis analysées avec le logiciel GenePix Pro version 4.0 (Axon Instrument).

### 1.3. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES

Après normalisation des données par une régression de type « loess » suivie d'une soustraction de la médiane par bloc, l'analyse différentielle de l'expression des gènes a été réalisée par un modèle de variance mixte qui identifie les groupes de gènes ayant une variance égale (Delmar *et al.*, 2005). Le nombre de faux-positifs a été contrôlé par la méthode de Bonferroni et la procédure de Benjamini-Hochberg (FDR) au seuil de 5 %. Afin de faciliter l'interprétation biologique des données, deux logiciels ont été utilisés (Metacore, Genego, IPA, Ingenuity) pour classer les gènes différentiellement régulés (GDR) par fonction biologique et déterminer leur implication dans les voies de signalisation et d'interactions moléculaires.

### 1.4. VALIDATION DE L'EXPRESSION DES GENES PAR RT-PCR EN TEMPS REEL

L'expression différentielle de treize GDR a été confirmée par PCR en temps réel à partir des échantillons d'ARNt utilisés pour les hybridations avec les lames 13K. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel PrimerExpress et synthétisées par Eurogentec. La PCR a été réalisée avec le *Master Mix SYBR-green* et un appareil ABI Prism 7000 (*Applied BioSystem*). L'expression de chaque gène a été rapportée à l'expression du gène de ménage RPL19.

### 1.5. CULTURES PRIMAIRES DE CELLULES ENDOMETRIALES BOVINES

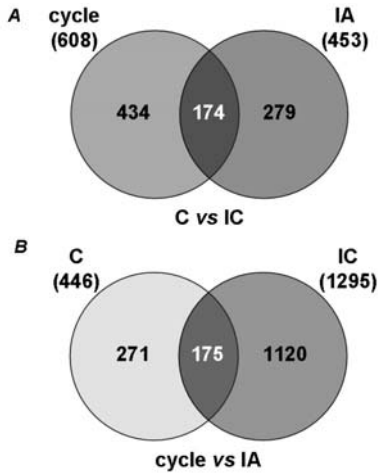
Les cultures primaires de fibroblastes (stroma) ou de glandes endométriales ont été préparées à partir d'endomètres prélevés sur des vaches normandes (n = 2) en phase lutéale. Leur réactivité vis-à-vis de l'IFN $\tau$  a été confirmée par la stimulation des gènes codant pour SOCS1 et -3 (*Suppressor of Cytokine Signaling*) (Sandra *et al.*, 2005) Après 24 h de culture en milieu sans sérum, les cellules ont été ou non stimulées avec de l'IFN $\tau$  recombinant ovin (100 ng / ml ou 1000 ng / ml) pendant 30 min, 2 h ou 24 h. Les ARNs totaux ont été extraits selon le protocole décrit en 1.2. et les quantifications de gène réalisées par PCR en temps réel (paragraphe 1.4.)

## 2. RESULTATS

### 2.1 ANALYSE DES PROFILS D'EXPRESSION [C VS. IC] DANS L'ENDOMETRE BOVIN CYCLIQUE OU EN COURS DE GESTATION (20<sup>ÈME</sup> JOUR POST ŒSTRUS).

Pour chaque animal, l'échantillon C a été comparé à l'échantillon IC sur la même lame. Les analyses mettent en évidence 608 GDR entre les deux zones endométriales des animaux cycliques et 453 GDR (dont 444 avec un différentiel d'expression supérieur à 2) chez les animaux gravides (figure 1).

**Figure 1 :** diagrammes de Venn des gènes différentiellement régulés (GDR) au 20<sup>ème</sup> jour *post-œstrus*. (A) Répartition des GDR [C vs. IC] entre les animaux cycliques et gravides (B) Répartition des GDR [cycle vs. IA] dans les zones [C] ou [IC]. Le nombre total de GDR est indiqué entre parenthèses pour chaque condition.



En terme de dominance d'expression dans l'une ou l'autre des zones endométriales (C>IC ou IC>C), la répartition des

GDR est équivalente, que ce soit chez les animaux cycliques ou les animaux gravides. Toutefois le diagramme de Venn montre que seulement 28 % des GDR [C vs. IC] des animaux cycliques sont communs avec ceux des gravides (174 gènes, figure 1).

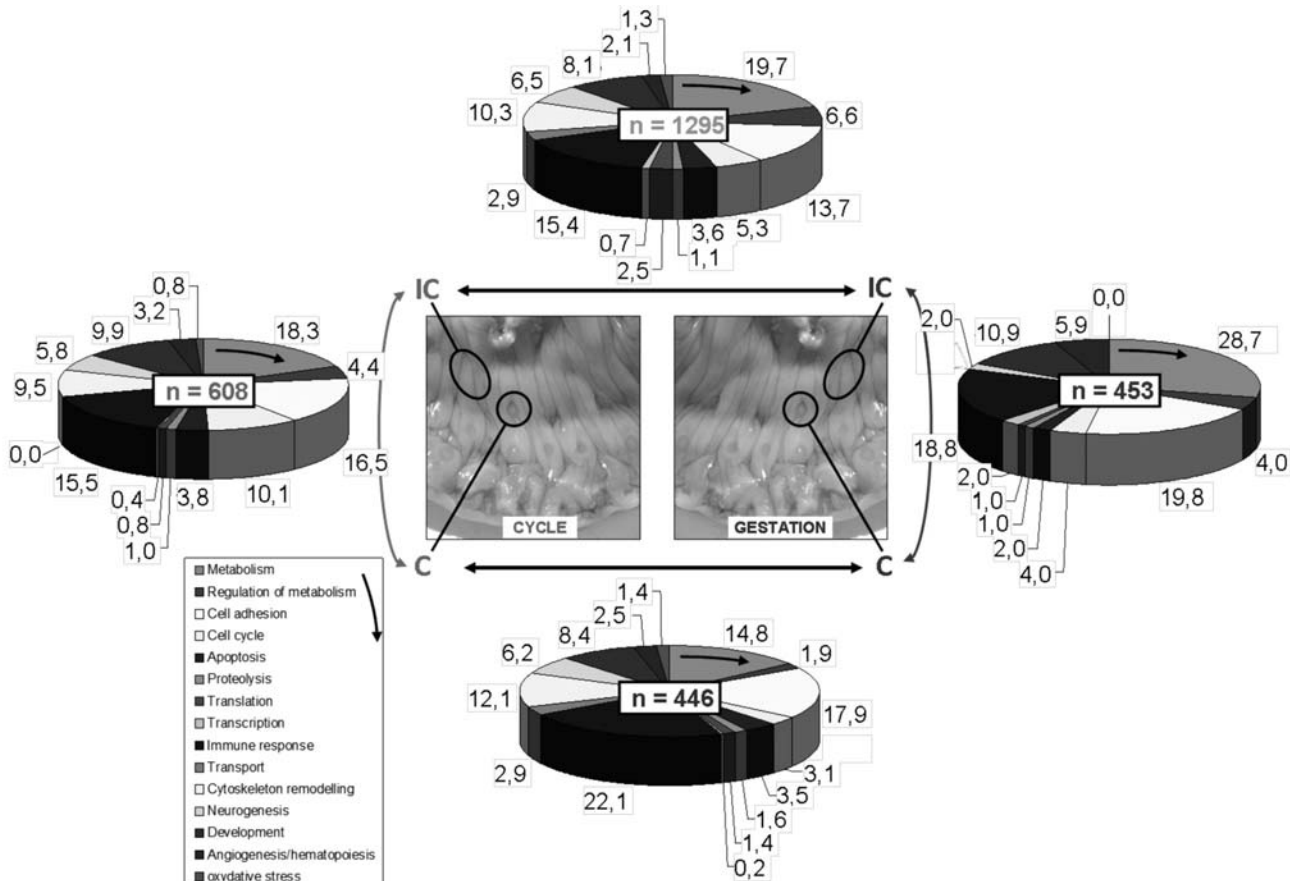
Chez les animaux cycliques, les GDR [C vs. IC] sont répartis dans toutes les fonctions biologiques (figure 2), avec un pourcentage important dans les fonctions « métabolisme » (18,3 %), « adhésion cellulaire » (16,5 %) ou « réponse immunitaire » (15,5 %). Chez les animaux gravides, ces trois fonctions biologiques représentent un pourcentage des GDR encore plus importants (28,7 %, 19,8 % et 18,8 % respectivement). Par ailleurs on constate la réduction du nombre de GDR dans la fonction « contrôle du cycle cellulaire » (de 10 % à 4 %, soit 60 GDR vs. 18 GDR) et la disparition de la fonction « remodelage du cytosquelette » (figure 2).

### 2.2 IMPACT DE LA GESTATION SUR LE TRANSCRIPTOME DES ZONES ENDOMETRIALES [C] OU [IC]

Les endomètres des animaux cycliques ont été comparés à ceux des animaux gravides en analysant les zones [C] et [IC] séparément. Dans les zones [C], parmi les 446 GDR identifiés (figure 2), 202 GDR présentent une surexpression chez les animaux CYC (par ex. NPY, Col1A2, Col3A1, Rarres) et 244 sont surexprimés chez les animaux IA (par ex. RSAD2, MX1, JSP-1, FABP3, ISG15).

Dans les zones [IC], parmi les 1295 GDR identifiés (figure 2), 762 sont surexprimés chez les animaux cycliques (par ex. Col1A2, OXTR, SNAI2, C10orf58, NPY) et 533 GDR chez les animaux gravides (par ex. RSAD2, IFI16, ISG15, MX1, JSP-1).

**Figure 2 :** Fonctions biologiques associées aux gènes différentiellement régulés dans l'endomètre bovin au 20<sup>ème</sup> jour *post-œstrus*. Le nombre total (n) de GDR est indiqué (FDR=5%). Le sens de lecture est indiqué par la flèche.



La répartition des GDR par fonction biologique révèle que les fonctions « métabolisme », « réponse immunitaire » et « adhésion cellulaire » sont les plus affectées, tant dans les zones [C] que dans les zones [IC]. Toutefois, l'implantation modifie de façon plus prononcée les voies « signalisation des interférons », « activation des cellules stellaires hépatiques » ou « présentation des antigènes » dans les zones [C] et les voies « ubiquitination des protéines » ou « phosphorylation oxydative » dans les zones [IC] (figure 2). La régulation de plusieurs GDR a été confirmée par PCR en temps réel, en particulier CXCL12, CXCR4 (voie des chémokines), IFIT5, MX1, MX2, RSAD2 (voie des interférons de type I) ainsi que C11orf34, FABP3, LGALS1, NPY, PTX3, PLAC8 ou SOCS6.

### 2.3 IFNTAU ET GENES ENDOMETRIAUX REGULES AU MOMENT DE L'IMPLANTATION

A partir d'endomètres bovin, les cellules fibroblastiques ou glandulaires ont été isolées et cultivées en présence d'IFNtau afin de déterminer si les gènes identifiés par transcriptomique au moment de l'implantation étaient ou non régulés par ce facteur, directement (30 min ou 2 h de traitement) ou indirectement (24 h de traitement). Ainsi, nous avons mis en évidence une régulation directe par l'IFNtau des gènes IFIT5, MX1, MX2, PTN, PTX3, RSAD2, indirecte de FABP3 et PLAC8 et aucune régulation de C11orf34, CXCL12, CXCR4, LGALS1, SOCS6 quel que soit la concentration d'IFNtau ou le type cellulaire utilisés (figure 3).

**Figure 3** : régulation de l'expression de gènes par l'IFNtau en cultures primaires de cellules endométriales bovines.

Régulation par l'IFNtau		
Directe (30 min ou 2 h)	Indirecte (24 h)	Aucune
		C11orf34
		CXCL12
		CXCR4
	FABP3	
IFIT5		
		LGALS1
MX1		
MX2		
	PLAC8	
PTN		
PTX3		
RSAD2		
		SOCS6

### CONCLUSION

En nous appuyant sur le réseau 13K, outil de transcriptomique haut débit et dédié à l'étude de la gestation, nous avons analysé et mis en évidence l'impact majeur de l'implantation sur la physiologie endométriale chez la vache. Parmi les gènes affectés, certains n'ont jamais été étudiés dans l'endomètre chez les mammifères (FABP3, SOCS6) ou uniquement chez d'autres espèces (souris: PTX3, Tranguch *et al.*, 2007, porc, souris et humain: C11orf34, Zhao *et al.*, 2004). Par ailleurs, sous l'influence du *conceptus*, nous confirmons la régulation de gènes récemment analysés chez la brebis (RSAD2, Song *et al.*, 2007) ou au cours du cycle chez la vache (NPY, LGALS1, Mitko *et al.*, 2008). Les gènes identifiés vont permettre d'ouvrir de nouvelles voies d'analyses pour la compréhension des mécanismes moléculaires de cette étape

clef de la gestation, en particulier lors de l'utilisation des biotechnologies de l'embryon (fécondation *in vitro*).

Les différences morphologiques de l'endomètre bovin – les zones [C] et [IC] – apparaissent clairement associées à des spécificités de transcriptome. Ainsi, par rapport aux études déjà publiées qui s'appuyaient uniquement sur les zones [IC] (Bauersachs *et al.*, 2006, Klein *et al.*, 2006), la distinction entre les deux zones endométriales apporte une analyse plus fine et détaillée des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de cette étape majeure de la gestation. En particulier, les voies de signalisation liées à l'immunité, sont plus affectées par l'implantation dans les zones [C] alors que celles liées au métabolisme le sont davantage dans les zones [IC].

Parmi les gènes soumis à une forte régulation lors de l'implantation, nous avons pu isoler plusieurs nouveaux gènes cibles directs ou indirects de l'IFNtau dans deux sous-populations de cellules endométriales. Ceci n'exclut pas la possibilité que ces gènes soient également régulés dans d'autres cellules de l'endomètre, en particulier les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires. Cette piste sera explorée dans un futur proche, en particulier les gènes liés à la fonction immunitaire qui forment une catégorie numériquement importante dans nos données et dont l'utilisation comme marqueurs non-invasifs de la gestation a été récemment proposée chez la vache (MX1, MX2, Gifford *et al.*, 2007).

*Les auteurs remercient JJ Daudin, C. Bigorne, A Bar-Hen et ML Martin-Magniette (UMR 518, AgroParisTech) pour leur participation et suggestions aux analyses statistiques. Ce travail a été soutenu par le réseau d'excellence EMBIC (Embryo Implantation Control) financé par l'Union Européenne (contrat LSHN-CT-2004-512040).*

Bauersachs S., Ulbrich SE., Gross K., Schmidt SE., Meyer HH., Wenigerkind H., Vermehren M., Sinowatz F., Blum H., Wolf E., 2006. *Reproduction*, 132, 319-31

Bazer FW., Spencer TE., Ott TL., 1997. *Am J Reprod Immunol.*, 37, 412-20

Delmar P., Robin S., Daudin JJ., 2005. *Bioinformatics*, 21, 502-508

Everts RE., Chavatte-Palmer P., Razzak A., Hue I., Green CA., Oliveira R., Vignon X., Rodriguez-Zas SL., Tian XC., Yang X., Renard JP., Lewin HA., 2008. *Physiol Genomics*. 33, 65-77

Gifford CA., Racicot K., Clark DS., Austin KJ., Hansen TR., Lucy MC., Davies CJ., Ott TL., 2007. *J Dairy Sci*. 90, 274-80

Humbolt P., 2001. *Theriogenology*, 56, 1417-33

Klein C., Bauersachs S., Ulbrich SE., Einspanier R., Meyer HH., Schmidt SE., Reichenbach HD., Vermehren M., Sinowatz F., Blum H., Wolf E., 2006. *Biol Reprod*. 74, 253-64

Martal JL., Chêne NM., Huynh LP., L'Haridon RM., Renaud PB., Guillomot MW., Charlier MA., Charpigny GY., 1998. *Biochimie*, 80, 755-77

Mitko K., Ulbrich SE., Wenigerkind H., Sinowatz F., Blum H., Wolf E., Bauersachs S., 2008. *Reproduction*, 135, 225-40

Paria BC., Reese J., Das SK., Dey SK., 2002. *Science*. 296, 2185-8

Sandra O., Bataillon I., Roux P., Martal J., Charpigny G., Renaud P., Bolifraud P., Germain G., Al-Gubory KH., 2005. *J. Mol. Endocrinol.*, 34, 637-44

Song G., Bazer FW., Spencer TE., 2007. *Reproduction*, 133, 285-95

Tranguch S., Chakrabarty A., Guo Y., Wang H., Dey SK., 2007. *Biol Reprod*. 77, 425-32

Zhao SH., Simmons DG., Cross JC., Scheetz TE., Casavant TL., Soares MB., Tuggle CK., 2004. *Genomics*, 84, 114-25