

Université de Montréal

**Analyse de l'expression génique dans les cellules de la  
granulosa de follicules dominants chez l'espèce bovine**

Par

Kalidou Dit Mamadou NDIAYE

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph. D.) en Sciences vétérinaires option Reproduction

Octobre 2004

© Kalidou Dit Mamadou NDIAYE, 2004



SF

607

U54

2005

v. 002

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Cette thèse intitulée

**Analyse de l'expression génique dans les cellules de la  
granulosa de follicules dominants chez l'espèce bovine**

Présentée par Kalidou Dit Mamadou NDIAYE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean SIROIS, président du jury, Université de Montréal

Dr Jacques G. LUSSIER, directeur de recherche, Université de Montréal

Dr David W. SILVERSIDES, co-directeur de recherche, Université de Montréal

Dr Armand TREMBLAY, membre du jury, Université de Montréal

Dr Jean-François ÉTHIER, examinateur externe, Université d'Ottawa

Dr Réjean LEFEBVRE, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance folliculaire terminale, l'ovulation et la lutéinisation sont peu connus. Ce projet cible une meilleure compréhension des déterminants moléculaires impliqués lors de ces processus physiologiques chez la vache. La croissance du follicule dominant suivie de son développement au cours du stade ovulatoire résulterait de la variation du profil d'expression spatio-temporel de gènes spécifiques. Les objectifs furent : 1) d'étudier l'expression génique dans les cellules de la granulosa (GC) de follicules dominants (DF) à jour 5 (J5) du cycle œstral comparativement aux follicules ovulatoires (OF) stimulés à l'hormone chorionique gonadotropine humaine (hCG). Cet objectif a été réalisé grâce à l'établissement d'une génothèque soustraite d'ADNc (DF-OF) par hybridation soustractive suppressive (SSH); et 2) de caractériser de nouveaux ADNc isolés d'une génothèque issue de GC de DF à J5. Suivant l'établissement de la génothèque DF-OF par SSH, 940 clones d'ADNc ont servi à établir des macro-réseaux qui furent criblés à l'aide de sondes d'ADNc marquées au P<sup>32</sup> et provenant de GC non-soustraites (DF, OF) ou soustraites (DF-OF, OF-DF). Les ADNc différentiellement exprimés ont été caractérisés par séquençage et comparés dans GenBank dévoilant 34 ADNc non redondants : 23 ADNc correspondant à des séquences dont la fonction est connue; 8 ADNc correspondant à des séquences complètes ou partielles mais de fonction inconnue; et 3 ADNc dont les séquences sont nouvelles. Les ADNc ApoER2, CPD, CYP11A, CYP19, FSHr et SERPINE2 ont été identifiés et avaient antérieurement été reconnus comme subissant une expression à la baisse ou réprimés dans les OF. L'expression différentielle de l'ARNm d'ARFGAP3,

CX43, CYP19, FSHr, FST, INHBA, LHr, LHr sans l'exon 10, PRG1, RPA2 et TRB2 fut confirmée par comparaison de leurs profils d'expression dans les GC issues de petits follicules (SF; 2-4 mm), DF, OF et le CL à J5. L'ADNc de TRB2 a été caractérisé (3571 pb) et code pour une protéine correspondant à une sérine/thréonine kinase atypique dont le domaine kinase est incomplet. L'analyse temporelle de son expression transcriptionnelle démontre une forte et rapide réduction dans les OF comparativement au DF dès 6 h suivant l'injection d'hCG. Les anticorps produits contre un fragment de TRB2 bovin ont démontré par immunobuvardage son expression dans les GC de SF et de DF mais la protéine était absente dans les OF et le CL. L'expression de TRB2 dans les GC pourrait être cruciale pour le contrôle de la prolifération cellulaire au cours de la croissance folliculaire. Deux nouveaux ADNc exprimés dans les GC de DF et codant pour des protéines membranaires correspondant à Derlin-1 (2617 pb) et LAPTM4B (1375 pb) ont été séquencés et leurs profils d'expression caractérisés. L'ARNm de Derlin-1 est exprimé de façon ubiquitaire tandis que LAPTM4B est différentiellement exprimé dans les tissus analysés. L'ARNm de LAPTM4B est principalement exprimé dans les GC de DF et réduit dans les OF. Des anticorps générés contre un fragment de LAPTM4B ont démontré par immunobuvardage et immunohistochimie une expression élevée dans les DF. LAPTM4B interviendrait dans la survie cellulaire. Nous avons identifié de nouveaux gènes exprimés différentiellement et dont l'expression est réduite par l'hCG/LH dans les OF. Ces gènes pourraient contribuer à la croissance folliculaire et, de façon permissive, grâce à leur réduction, à l'ovulation et/ou à la lutéinisation.

Mots-clés : bovin, granulosa, follicules, ARFGAP3, LAPTM4, PRG1, RPA2, TRB2.

## Abstract

Molecular mechanisms involved in terminal follicular growth, ovulation and luteinization are poorly understood. This project targets a better understanding of the molecular determinants involved during these physiological processes in cattle. The underlying hypothesis is that the growth of the dominant follicle followed by its development into an ovulatory follicle results from spatio-temporal variation in the expression profile of specific genes. The objectives were: 1) to identify differentially expressed genes in granulosa cells (GC) of dominant follicles (DF) at day 5 (D5) of the estrous cycle compared to ovulatory follicles (OF) following hCG injection using the suppression subtractive hybridization (SSH) technology; and 2) to characterize new cDNAs isolated from a GC library from DF at D5. A subtracted cDNA library was generated using SSH, from which 940 clones were randomly selected and used to generate identical macro-arrays. These macro-arrays were differentially screened using complex radioactives probes generated from unsubtracted (DF, OF) and subtracted (DF-OF, OF-DF) cDNAs. The differentially expressed cDNAs were characterized by sequencing, and compared in GenBank data bases revealing 34 non-redundant cDNAs classified as following: 23 cDNAs with known sequences and functions; 8 cDNAs with partially or completely known sequences but unknown function; and 3 cDNAs with novel sequences. The cDNAs including ApoER2, CPD, CYP11A, CYP19, FSHr, and SERPINE2 were identified and previously known to be down-regulated by hCG. Differential mRNA expression of ARFGAP3, CX43, CYP19, FSHr, FST, INHBA, LHr, LHr without exon 10, PRG1, RPA2, and TRB2 were determined by comparing their expression profiles in GC of follicles at different

developmental stages and CL at D5. The cDNA of TRB2 was characterized (3571 bp) and encodes an atypical serine/threonine kinase protein with an incomplete kinase domain. Temporal analysis of TRB2 mRNA expression showed a strong and rapid reduction in OF compared to DF 6 h after hCG injection. Western blot analysis using anti-TRB2 antibody revealed the expression of TRB2 in GC of small follicles (2-4 mm) and DF but its absence in hCG-induced follicles and CL. The expression of TRB2 in GC appears to be crucial for the control of cellular proliferation during follicular growth. Two new cDNAs expressed in GC of DF encoding for membrane proteins, Derlin-1 (2617 bp) and LAPTM4B (1375 bp), were sequenced and their expression profiles characterized. The Derlin-1 mRNA was expressed in an ubiquitous fashion while LAPTM4B was differentially expressed in the tissues analyzed. The LAPTM4B mRNA was mainly expressed in GC of DF and reduced in hCG-induced OF. Western blot analysis and immunohistochemistry observations using an anti-LAPTM4B antibody demonstrated higher expression in DF and reduction in OF. LAPTM4B may be involved in cellular survival. In conclusion, this project allowed the identification of novel genes that are differentially expressed and are reduced or down-regulated by hCG/LH in OF. These genes may contribute to follicular growth and may contribute to ovulation and/or luteinization, in a permissive fashion, due to their reduction,.

Key words: bovine, granulosa, follicles, ARFGAP3, LAPTM4, PRG1, RPA2, TRB2.

## Table des matières

	Pages
Page titre	i
Page d'identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiv
Dédicace	xxi
Remerciements	xxii
<b>Chapitre 1</b>	
1. Introduction	1
2. Recension de la littérature	5
2.1. La folliculogenèse	5
2.2. Recrutement folliculaire initial et cyclique	7
2.2.1. Recrutement initial	8
2.2.2. Recrutement cyclique	11
2.3. Sélection du follicule dominant	16
2.4. Établissement de la dominance folliculaire	21
2.5. La stéroïdogenèse	28
2.6. Rôle des hormones et des facteurs de croissance dans la folliculogenèse	34
2.6.1. Action des hormones	34
2.6.2. Contrôle local de l'ovaire et du processus de la dominance	37
2.6.2.1. Les IGF	37
2.6.2.2. Les TGFβ	40

2.6.2.3. Les FGF	41
2.6.2.4. L'EGF/TGF $\alpha$	41
2.7. Croissance et maturation ovocytaires	42
2.8. Rôle de l'ovocyte et des jonctions perméables	45
2.9. Ovulation et formation du corps jaune	48
2.9.1. Le processus ovulatoire	48
2.9.2. La formation du corps jaune	55
2.10. L'atrésie folliculaire	57
2.11. Identification de gènes impliqués dans le développement folliculaire	63
3. Hypothèse, modèle d'étude et objectifs	66

## Chapitre 2

ARTICLE # 1 : Identification of down-regulated mRNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin (hCG).	69
Abstract	70
Introduction	71
Materials and Methods	73
Results	83
Discussion	88
References	98

## Chapitre 3

ARTICLE # 2 : Caractérisation moléculaire de <i>Tribbles homolog 2</i> (TRB2) bovin et analyse de l'expression de l'ARNm dans les follicules ovariens.	116
Résumé	117
Introduction	118
Matériel et Méthodes	120
Résultats	126
Discussion	129
Références	134

## Chapitre 4

ARTICLE # 3 : Molecular characterization of the lysosomal-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) reveals a differential expression pattern in granulosa cells.	150
Abstract	151
Introduction	153
Materials and Methods	154
Results	163
Discussion	168
References	173

## Chapitre 5

4. Discussion générale	193
4.1. Utilisation de la SSH pour l'étude de l'expression différentielle des gènes dans les follicules dominants	193
4.1.1. Analyse de l'efficacité de la soustraction effectuée lors de la SSH	196
4.1.2. Analyse transcriptionnelle des gènes identifiés par la SSH	197
4.1.2.1. CYP19, CYP11A, ApoER2, CPD et SERPINE2	198
4.1.2.2. CX43	202
4.1.2.3. FSHr et LHr	204
4.1.2.4. INHBA et FST	209
4.1.2.5. PRG1	212
4.1.2.6. ARFGAP3	214
4.1.2.7. RPA2	215
4.1.3. Perspectives	218
4.2. Caractérisation de « <i>Tribbles homolog 2</i> » (TRB2)	219
4.3. Caractérisation de LAPTM4B et de Derlin-1	221
4.3.1. Établissement et validation de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa de follicules dominants	221
4.3.2. Caractérisation de LAPTM4B	222

4.3.2.1. Caractéristiques et expression de LAPTM4B	222
4.3.2.2. Perspectives	228
4.3.3. Caractérisation de Derlin-1	230
5. Conclusion	233
<b>Annexes</b>	
Annexe 1 : Caractérisation de Derlin-1	236
Annexe 2 : Caractérisation d'un isoforme du récepteur à la LH	245
Annexe 3 : Caractérisation de la région 5' de LAPTM4B	251
6. Références	255

**Liste des tableaux**

<b>Chapitre 2</b>		108
Table 1	Identity of cDNA clones found to be differentially expressed by SSH in bovine granulosa cells of DF compared to OF.	

## Liste des figures

### Chapitre 2

Figure 1.	Analyses of the cDNA subtraction efficiency.	104
Figure 2.	Representative differential screening results by macro-arrays of the DF-OF subtracted cDNA library.	106
Figure 3.	Analysis of mRNA expression by virtual Northern blot.	112
Figure 4.	Analysis of mRNA expression by RT-PCR.	114

### Chapitre 3

Figure 1.	Séquences complètes de l'ADNc de TRB2 et des acides aminés déduits.	137
Figure 2.	Comparaison des acides aminés de la protéine TRB2 bovine à ses orthodoxes.	140
Figure 3.	Analyse transcriptionnelle de l'ARNm de TRB2 par northern.	142
Figure 4.	Analyse de l'expression d'ARNm de TRB2 par northern virtuel.	144
Figure 5.	Analyse de l'expression temporelle de l'ARNm de TRB2 au cours de la période péri ovulatoire par northern virtuel.	146
Figure 6.	Expression de la protéine TRB2 étudiée par analyse western.	148

### Chapitre 4

Figure 1	Nucleotide and amino acid sequences of the bovine LAPTM4B.	177
Figure 2	Comparison of the bLAPTM4B amino acids to other related LAPTM4B.	179
Figure 3	Expression of bLAPTM4B mRNA in bovine tissues by northern blot.	181
Figure 4	Analysis of bLAPTM4B mRNA expression during follicular development by virtual northern blot.	183

Figure 5	Expression of the bLAPTM4B protein analyzed by Western blot using anti- $\Delta$ bLAPTM4B antibody.	185
Figure 6	Immunolocalization of LAPTM4B protein.	187
<b>Annexe 1</b>		
Figure 1.	Séquences complètes de l'ADNc de Derlin-1 bovin et de la protéine déduite.	238
Figure 2.	Comparaison des acides aminés de la protéine Derlin-1 bovine à ses orthodoxes.	241
Figure 3.	Analyse transcriptionnelle de l'ARNm de Derlin-1 par northern.	243
<b>Annexe 2</b>		
Figure 1	Comparaison des séquences d'acides nucléiques et aminés du récepteur complet de la LH (LHr) et de la forme du LHr dont l'exon 10 est épissé (LH-F).	247
<b>Annexe 3</b>		
Figure 1	Séquence 5'-UTR de LAPTM4B.	253

### Liste des abréviations

(Note : la définition anglophone des gènes a été conservée par souci de cohérence à la nomenclature disponible par le « *National Center for Biotechnology Information* » ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))).

17  $\beta$ -HSD : 17 beta-hydroxysteroid deshydrogenase

3  $\beta$ -HSD : 3 beta-hydroxysteroid deshydrogenase

ADAM : A disintegrin and metalloproteinase

ADAMTS : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondine motifs

ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AIF : Apoptotic inducing factor

Akt : Protéine kinase B

AMH : Anti-mullerian hormone = Mullerian inhibiting substance (MIS)

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Apaf1 : Apoptotic protease activating factor 1

ARF 6 : Adenosine diphosphate (ADP) ribosylation factor 6

ARFGAP : ADP-ribosylation factor GTPase activating protein

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

Bax : Bcl2-Associated X Protein (Protéine pro-apoptotique)

Bcl2 : B cell leukemia (protéine anti-apoptotique)

Bid : BH3 interacting domain death agonist (Protéine pro-apoptotique)

- BMP15 : Bone morphogenetic protein
- CAK : Cyclin-dependant kinase Activating-Kinase
- Caspase : Cysteiny aspartate-specific proteinase
- CDK : Cyclin-dependant kinase
- Ced-3 : *C. elegans* cell death gene (Protéine pro-apoptotique)
- CL : Corpus luteum (corps jaune)
- COC : Complexe ovocyte cumulus
- COX-2 : Cyclooxygenase-2 = Prostaglandin G/H Synthase-2
- CPD : Carboxypeptidase D
- CX : Connexine
- CYP11A : Cytochrome P<sub>450</sub> side chain cleavage enzyme
- CYP17A1 : Cytochrome P<sub>450</sub> 17-alpha hydroxylase
- CYP19 : Cytochrome P<sub>450</sub> aromatase enzyme
- DAG : Diacylglycérol
- DAX-1 : Dosage sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical  
region on the X chromosome gene 1
- DDRT-PCR : Differential display reverse transcriptase-polymerase chain  
reaction
- DF : Follicule dominant à jour 5 du cycle œstral
- DISC : Death-inducing signaling complex
- DNA-PK : DNA-dependant protein kinase
- E2 : Oestradiol-17beta
- EC : Extracellulaire
- eCG : Equine chorionic gonadotropin

EGF : Epithelial growth factor

EP2 : Prostaglandine E<sub>2</sub> receptor

ER : Réticulum endoplasmique

ER  $\alpha$  : Estrogen receptor alpha

ER  $\beta$  : Estrogen receptor beta

EST : Expressed sequence tags

FADD : Fas-associated protein with death domain

FGF : Fibroblast growth factor

FGIF : Follicle growth inhibitory factor

FOXO3a : Forkhead in Rhabdomyosarcoma-like 1

FSH : Hormone folliculo-stimulante

FSHr : Récepteur à la FSH

FST : Follistatine

GAG : Glycosaminoglycans

GAP : GTPase-activating protéine

GAPD : Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase

GC : Cellules de la granulosa

GDF-9 : Growth differentiation factor 9

GDF-9B : Growth differentiation factor 9B = Bone morphogenetic protein15

GH : Growth hormone

GnRH : Gonadotropin releasing hormone

GTP : Guanosine triphosphate

GVBD : Germinal vesicle breakdown

Gs : Protéine G stimulante

HA : Acide hyaluronique

HAS-2 : Hyaluronan synthase-2

HCG : Gonadotropine chorionique humaine

I $\alpha$ I : Serum-derived inter alpha-inhibitor

IAP : Inhibitor of apoptosis proteins (Inhibiteur des caspases)

ICE : Interleukin-1-beta-converting enzyme = caspase 1

IGF : Insulin-like growth factor

IGFBP : IGF binding proteins

IGFR1 : Récepteur de type 1 de l'IGF

INHBA : Sous-unité beta A de l'activine/inhibine

IP3 : Phosphatidyl inositol triphosphate

IP3-K : Phosphatidyl inositol 3-kinase

kDa : kilo Dalton

LAPTM : Lysosomal-associated protein transmembrane

LDL : Low-density lipoprotein

LH : Hormone lutéinisante

LHr : Récepteur à la LH

MAPK : Mitogen-activating protein kinase

MIS : Mullerian inhibiting substance

MPF : Maturation promoting factor

MTP : Mouse transporter protein

OF : Follicule ovulatoire

OMI : Oocyte meiosis inhibitor

ORF : Open reading frame (cadre de lecture ouvert)

OTr : Récepteur à l'ocytocine

P27KIP et P21CIP : Inhibiteurs de la MPF

P34cdc2 : Cell division cycle (sous-unité de la MPF)

P4 : Progestérone

P450arom : Cytochrome P<sub>450</sub> aromatase enzyme

P450scc : Cytochrome P<sub>450</sub> side chain cleavage

PA : Activateur du plasminogène

PACAP : Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

PAI : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène

PAPP-A : Pregnancy-associated plasma protein-A

PCR : Polymerase chain reaction

PK1 : Phosphatidyl inositol-dependant kinase 1

PG : Prostaglandin

PGC : Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma co-activator

PGE2 : Prostaglandine E2

PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2 $\alpha$

PGHS-2 : Prostaglandin H/S synthase 2 = Cox-2

pI : Point isoélectrique

PIP2 : Phosphatidyl inositol diphosphate

PIT 1 : Pituitary-specific transcription factor 1

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKB : Protéine kinase B = Akt

PKC : Protéine kinase C

PLA2 : Phospholipase A2

PMSG : Pregnant-mare serum gonadotropin

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PR : Récepteur à la progestérone

PRG : Proteoglycan

PROP1 : Prophet of PIT 1

RFA : Replication factor A

RLF : Relaxin-like factor

RPA : Replication protein A

RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction

SAGE : Serial analysis of gene expression

SF-1 : Steroidogenic factor-1

SGK : Serum and glucocorticoid-induced kinase

SSB : Single-stranded-DNA binding protein

SSH : Hybridation soustractive suppressive

StAR : Steroidogenic acute regulatory protein

TGF- $\alpha$  : Transforming growth factor-alpha

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor-beta

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor-alpha

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TNFRSF1 : Tumor necrosis factor receptor subfamily 1

tPA : Tissue plasminogen activator

TRB2 : Tribbles homolog 2

TSG-6 : Tumor necrosis factor-stimulated gene 6

TSH : Hormone thyroïdo-stimulante

u-PA : urokinase-plasminogen activator

UTR : Untranslated region (région non-codante)

VEGF : Vascular endothelial growth factor

WT1 : Wilm's tumor gene

ZP : Zone pellucide

## **Dédicace**

Je dédie ce travail à ma mère Coumba qui nous a quitté trop tôt.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le docteur Jacques G. Lussier qui m'a accueilli dans son laboratoire pour un stage qui devait durer 10 mois. Près de cinq années ont passé depuis mon arrivée et le Dr Lussier m'a guidé dans une entreprise de recherche enrichissante et hautement exaltante qui a abouti, en plus de mon stage, aux diplômes de maîtrise et de doctorat en Sciences vétérinaires (Reproduction). Il a été un directeur de recherche disponible et efficace qui a su allier, avec un remarquable équilibre, rigueur scientifique, patience et affection. De toute évidence, toute ma gratitude et ma reconnaissance lui sont dues.

Je dois aussi présenter mes remerciements à l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) qui m'a octroyé une bourse de mobilité et a ainsi rendu possible la réalisation de mon stage à l'Université de Montréal. Dans ces remerciements, j'inclus naturellement les personnes qui ont travaillé avec acharnement et avec beaucoup de disponibilité à l'acheminement de mon dossier entre l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal) et l'Université de Montréal. Il s'agit de Mme Fabar Sané du bureau Afrique de l'AUF à Dakar, de Mme Jocelyne Duguay du bureau Amérique du Nord de l'AUF à Montréal, de Mme Carole Paquin du bureau de la coopération internationale à Montréal et de Mme Micheline St-Germain qui a eu à gérer mon dossier à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. À toutes ces personnes, un grand merci pour leur aide précieuse et leurs encouragements.

Mes remerciements vont aussi à mon co-directeur de recherche, le Dr David W. Silversides pour sa jovialité et ses idées pertinentes que j'ai toujours eues du plaisir à écouter. J'aimerais remercier le Dr Armand Tremblay qui a été un conseiller pédagogique éclairé dont j'ai pu profiter des conseils pratiques dès mon arrivée et tout au long de mon séjour. Ces remerciements vont aussi au Dr Jean Sirois pour ses commentaires toujours bienvenus. Je remercie le Dr Jean-François Éthier de l'Université d'Ottawa en sa qualité d'examineur externe d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier M. Luc Vermette et M. Nabil Fetni qui m'ont accueilli et ont facilité mes débuts au laboratoire en plus de leur soutien de tout temps. Je n'oublierai pas de remercier Mme Micheline Sicotte pour sa remarquable disponibilité ainsi que tout le personnel du CRRA, professeurs et étudiants, spécialement mes collègues de travail des laboratoires des Dr Lussier et Silversides. Mes remerciements vont à Mme Manon Salvas pour sa générosité incroyable et sa promptitude à réaliser le travail. J'associe à ces remerciements Mme Isabelle Daneau qui a eu à effectuer, avec Mme Salvas, un grand nombre de séquençage des clones présentés dans cette thèse. Enfin, mes remerciements vont à Mme Marjolaine N. Rousseau pour le temps consacré à corriger mes fautes.

## **CHAPITRE 1**

## 1. Introduction

Chez la vache, l'appareil génital présente au cours de la période post-pubertaire des modifications morphologiques et physiologiques périodiques, suivant un rythme bien défini, connues sous le nom de cycle œstral. Ces modifications débutent au moment de la puberté, se poursuivent tout au long de la vie génitale et, dans les conditions normales, ne sont interrompues que par la gestation. Elles dépendent du fonctionnement cyclique de l'ovaire par l'intermédiaire de ses sécrétions hormonales, elles-mêmes sous la dépendance étroite des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'ovaire est un organe doué d'une double fonction : une fonction exocrine ou gamétogénique et une fonction endocrine. Ces deux fonctions sont étroitement liées à l'évolution d'une même unité morphologique qui est le follicule ovarien.

Chez la vache pubère, les follicules ovariens préformés à la naissance se développent et ovulent spontanément et de façon périodique pour former le corps jaune. Le follicule se présente dans l'ovaire sous diverses étapes de développement se situant entre le follicule primordial et le follicule ovulatoire d'où sera libéré l'ovocyte au moment de l'ovulation. Cependant, la majorité des follicules n'atteindront jamais le stade ovulatoire et subiront l'atrophie durant les stades préantral et antral précoce (Tilly, 1996; Knight & Glister, 2001). Les follicules en croissance remplissent une double fonction à savoir, d'une part, la production des stéroïdes qui jouent un rôle clé dans le contrôle de la fonction de la reproduction, et d'autre part, ils supportent la croissance, la maturation et l'expulsion de l'ovocyte.

Les follicules amorcent leur croissance à partir de la réserve des follicules primordiaux sous l'influence de mécanismes encore incompris (Fortune et al., 2000). Ils poursuivent une phase de croissance indépendante des hormones gonadotropes représentée par le stade folliculaire non-antral. Les follicules acquièrent un antra à environ 0.2 mm de diamètre chez la vache et deviennent dépendants d'une concentration basale d'hormone folliculo-stimulante (FSH; Shome & Parlow, 1974a, 1974b; Watkins et al., 1987). Chez la vache, le développement folliculaire se fait de façon continue à partir du follicule primordial (0.03 mm de diamètre) jusqu'au stade antral d'environ 3 à 4 mm (Lussier et al., 1987). À ce dernier stade, plusieurs follicules sont recrutés de façon périodique sous l'influence d'une augmentation de la concentration sanguine en FSH (Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996). Suite à la phase de recrutement folliculaire, un seul follicule est sélectionné afin de poursuivre son développement et est identifié comme étant le follicule dominant. Les follicules non sélectionnés ou subalternes dégèrent par atresie (Markström et al., 2002).

La phase de recrutement des follicules de 3 à 4 mm de diamètre survient périodiquement deux à trois fois dans un cycle œstral de 21 jours en moyenne (Roche, 1996; Fortune et al., 2000; Ginther et al., 2001). Les variations périodiques de la concentration sanguine en FSH au cours du cycle œstral, responsables du recrutement des follicules de diamètre supérieur à 3 mm, sont contrôlées par l'augmentation d'œstradiol-17- $\beta$  (E2) et d'inhibine sécrétées par le follicule dominant. Selon le temps du cycle œstral, le follicule dominant ovulera libérant l'ovocyte ou dégèrera par atresie (Markström et al., 2002; Richards et al., 2002). Au cours de la croissance des follicules au-delà de 5-6 mm, les cellules de la

granulosa des follicules recrutés acquièrent des récepteurs à l'hormone lutéinisante (LHR; McFarland et al., 1989) permettant ainsi de transférer sa dépendance vis-à-vis de la FSH vers l'hormone lutéinisante (LH; Shome & Parlow, 1973). Toutefois, les mécanismes sous-jacents qui régissent la sélection et l'établissement de la dominance folliculaire ainsi que l'ovulation sont encore peu connus (Roche, 1996; Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2001; Zeleznik, 2001b).

L'étude de l'expression des gènes lors des processus tels que la croissance, la sélection et la dominance folliculaires ainsi que l'ovulation permettrait de mieux comprendre ces processus physiologiques. Les cellules de la granulosa constituent la population cellulaire cible à étudier puisque, sur le plan physiologique, elles supportent les fonctions reproductrices en contribuant à la synthèse d'hormones stéroïdiennes et peptidiques (Knight & Glister, 2001), à la maturation des ovocytes (Brower & Schultz, 1982; Chesnel et al., 1994; De la Fuente & Eppig, 2001; Eppig et al., 2002) et à la formation du corps jaune suite à l'ovulation (Rosenfeld et al., 2001). Diverses approches permettent l'identification et la caractérisation des gènes dans un tissu donné, par exemple : 1) la caractérisation systématique ou aléatoire d'acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc; Jordan, 2001; Strausberg et al., 2002; Imanishi et al., 2004; Ota et al., 2004); 2) le criblage de génothèques soustraites d'ADNc (Wang & Brown, 1991; Tosser-Klopp et al., 1997); 3) l'étalement différentiel des ARNm ou le « *Differential Display* » RT-PCR (DDRT-PCR; Martin & Pardee, 1999; Liang, 2002); 4) le « *Serial Analysis of Gene Expression* » (SAGE; Velculescu et al., 1995; Carulli et al., 1998); et 5) l'approche d'hybridation soustractive suppressive (SSH; Diatchenko et al., 1996, 1999). Ces approches sont

dans leur ensemble valables mais peuvent présenter certaines limites. La 1<sup>ère</sup> et la 5<sup>ième</sup> approches ont été employées dans le cadre de ce travail (voir section 2.11).

## 2. Recension de la littérature

### 2.1. La folliculogénèse

Chez la plupart des espèces d'animaux domestiques, l'ovogénèse débute pendant la vie fœtale permettant la constitution d'une réserve de follicules primordiaux (Tassel et al., 1983; Gougeon et al., 1992; Gougeon, 1994). C'est à partir de cette réserve que les follicules initient leur croissance. Toutefois, une récente étude (Johnson et al., 2004) semble démontrer que les mammifères femelles ne naissent pas avec un stock définitif d'ovocytes dans leurs ovaires. Cette étude stipule qu'en réalité, les ovocytes seraient produits tout au long de la vie des mammifères à partir de cellules souches. Cette étude est, somme toute, très controversée et soulève des questions quant à la présence de ce phénomène chez toutes espèces de mammifères ou seulement chez la souris. Les premiers stades de la folliculogénèse ovarienne sont morphologiquement similaires chez différentes espèces même si le développement folliculaire dans le temps diffère. Il est admis que de très nombreux follicules entament leur développement durant chaque cycle œstral et que la plupart de ceux-ci s'atrécient. Les principales caractéristiques de la croissance folliculaire chez la vache concernent le faible nombre de follicules qui parviennent jusqu'à l'ovulation et le parallélisme entre la croissance du follicule et l'acquisition de la compétence ovulatoire. Seule une très faible proportion des follicules primordiaux emmagasinés dans l'ovaire entament une croissance alors que plus de 99 % des follicules primordiaux sont voués à l'atrésie (Richards & Hedin, 1988). La phase de maturation ne concerne que quelques centaines de follicules. Au cours de chaque cycle œstral, un

ou plusieurs follicules, selon qu'il s'agisse d'espèces monotociques ou polytociques, subissent une maturation vers l'ovulation.

La formation des follicules primordiaux dépend de la présence des ovocytes et de leurs interactions avec les cellules somatiques qui les entourent et qui représentent les cellules de la prégranulosa (Richards, 2001b; Britt & Findlay, 2002). Cette population de follicules primordiaux est très hétérogène, tant par le diamètre des ovocytes que par le nombre et la forme (aplatie ou ronde) des cellules de la granulosa (Mariana, 1972). Les follicules primordiaux restent au repos jusqu'à la maturation sexuelle de l'organisme durant laquelle un petit nombre de follicules subissent graduellement une activation vers le stade de follicules primaires (Baker & Neal, 1974). Le mécanisme d'activation des follicules primordiaux en follicules primaires est très peu connu. Cependant, il est caractérisé par la croissance de l'ovocyte et le changement dans la forme des cellules de la granulosa qui deviennent cuboïdales (Lintern-Moore & Moore, 1979; Fortune, 2003).

L'initiation de la croissance folliculaire induit une série de changements morphologiques caractéristiques à l'intérieur du follicule ainsi que la régulation coordonnée de plusieurs gènes (Richards et al., 1995; Driancourt & Gougeon, 1999). Ces changements incluent la croissance de l'ovocyte, la prolifération des cellules de la granulosa menant à la formation de multiples couches et aussi la formation de la couche thécale autour du follicule à l'extérieur de la membrane basale. Avant la formation de l'antra, la croissance des follicules est gonadotropine-indépendante et semble être contrôlée par des mécanismes intraovariens et intrafolliculaires (Elvin & Matzuk, 1998; Smits & Cotvrindt, 2002). La formation de l'antra débute dans les

follicules de 0.12 à 0.16 mm de diamètre chez l'espèce bovine (Lussier et al., 1987). Plusieurs facteurs dont la FSH, l'insuline et l'IGF-1 induisent, séparément, la formation de l'antra dans des follicules préantraux en culture (Gutierrez et al., 2000; Itoh et al., 2002). Le développement de l'antra permet la ségrégation de certaines cellules de la granulosa en cellules du cumulus qui se différencient en couronne radiaire (*corona radiata*) entourant directement l'ovocyte et lui envoyant de fins prolongements. Les cellules du cumulus et de la couronne sont principalement impliquées dans la communication entre l'ovocyte et les cellules folliculaires environnantes (Fletcher & Greenan, 1985).

Un grand nombre de facteurs de croissance folliculaires incluant la superfamille des « *Transforming Growth Factor-Beta* » (TGF- $\beta$ ; Derynck et al., 1985), les « *Fibroblast Growth Factors* » (FGF; Jaye et al., 1986; Mergia et al., 1986; Ueno et al., 1987a), l'« *Epithelium Growth Factor* » (EGF; Cohen, 1962; Carpenter & Cohen, 1979; Gray et al., 1983), le « *Transforming Growth Factor alpha* » (TGF- $\alpha$ ; Derynck et al., 1984; Brissenden et al., 1985a, 1985b) aussi bien que les « *Insulin-like Growth Factors* » (IGFs; Brissenden et al., 1984; Tricoli et al., 1984) sont maintenant connus comme étant impliqués dans le contrôle de la croissance folliculaire. Les follicules nouvellement formés et ceux en croissance précoce renferment des facteurs de croissance ou des récepteurs de facteurs de croissance soit dans l'ovocyte ou dans les cellules de la granulosa (McNatty et al., 2000).

## **2.2. Recrutement folliculaire initial et cyclique**

Lorsque les follicules ovariens sont formés, ils constituent la réserve de follicules primordiaux au repos qui persistent pour une période de temps variable

d'un follicule à un autre. Les follicules primordiaux sont recrutés à partir de la réserve de follicules en croissance de façon continue alors que l'augmentation de la FSH circulante durant chaque cycle reproductif recrute une cohorte de follicules antraux. Ces deux événements sont respectivement désignés recrutement initial et recrutement cyclique (McGee & Hsueh, 2000).

### **2.2.1. Recrutement initial**

Durant le recrutement initial, des facteurs intraovariens et/ou d'autres facteurs inconnus stimulent certains follicules primordiaux pour initier la croissance, tandis que le reste des follicules demeurent quiescents pour des mois ou des années. Il s'agit d'un processus continu initié juste après la formation des follicules primordiaux. Pour les follicules non recrutés, leur devenir est de rester dormants. Ces follicules sont probablement soumis à des influences inhibitrices constantes d'origine systémique et/ou locale (Wandji et al., 1996). Cependant, le nombre de follicules primordiaux dormants n'altère pas le nombre de follicules impliqués dans l'initiation de la croissance folliculaire (Elvin & Matzuk, 1998). La baisse d'influences inhibitrices et/ou l'augmentation de facteurs stimulateurs permettent l'initiation de la croissance folliculaire. Toutefois, les mécanismes responsables de l'activation du follicule primordial ainsi que du choix du moment de l'initiation demeurent inconnus. La FSH n'est pas impliquée dans ce processus d'initiation de la croissance folliculaire ou recrutement initial (Peters et al., 1975). Par contre, l'implication de la progestérone (P4) et de l'E2 dans l'inhibition de l'activation des follicules primordiaux a été démontrée (Kezele & Skinner, 2003). La réduction de la concentration de ces hormones pourrait ainsi stimuler l'activation des follicules primordiaux.

Des facteurs impliqués dans la communication cellulaire entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa lors du recrutement initial ont été proposés. Un facteur spécifique lié à l'activation des follicules primordiaux est « *Kit Ligand* » encore appelé « *Stem Cell Factor* » ou « *Steel Factor* » (Martin et al., 1990). « *Kit Ligand* » est produit par les cellules de la granulosa alors que son récepteur, « *c-Kit* », un récepteur tyrosine kinase, est exprimé par les cellules germinales primordiales, les ovocytes et les cellules thécales (Manova et al., 1993; Motro & Bernstein, 1993; Fortune et al., 2000). Le facteur « *Kit Ligand* » est fortement exprimé dans les follicules secondaires, donc des follicules en croissance, et joue probablement un rôle important dans le développement des follicules préantraux (Elvin et al., 1999). Il a été démontré (Elvin & Matzuk, 1998) que la signalisation intrafolliculaire à partir des cellules de la granulosa vers l'ovocyte par l'intermédiaire de la voie « *Kit Ligand/c-Kit receptor* » est critique pour le développement des follicules préantraux. Des mutations chez la souris empêchant la production de « *Kit Ligand* » au-delà du stade primaire mène à l'échec de la croissance folliculaire (Kuroda et al., 1988; Huang et al., 1993; Bedell et al., 1996). Il reste à établir si « *Kit Ligand* » agit seul ou en bloquant la production d'une molécule associée à la quiescence folliculaire comme le TGF- $\beta$  ou en stimulant la production d'une molécule associée au début de la croissance comme le TGF- $\alpha$  (Driancourt et al., 2001) ou si les deux événements sont simultanément impliqués (Gougeon & Busso, 2000). Les interactions entre « *c-Kit* » et « *Kit Ligand* » apparaissent être significatives pour l'ovogenèse et la folliculogenèse incluant l'initiation de la croissance folliculaire, la formation de l'antra et de la thèque ainsi que la maturation de l'ovocyte (Driancourt et al., 2000).

Le développement des follicules préantraux nécessite aussi la présence du «*Growth Differentiation Factor-9*» (GDF-9; Incerti et al., 1994; McGrath et al., 1995). Ce dernier est un membre des facteurs de croissance sécrétés de la superfamille des TGF- $\beta$ . Les souris femelles déficientes en GDF-9 montrent un blocage dans le développement folliculaire au stade primaire (Gong et al., 1996; Elvin & Matzuk, 1998) et éventuellement la mort de l'ovocyte (Elvin et al., 1999). Le GDF-9 est produit par les ovocytes en croissance, soit des follicules primaires jusqu'au stade ovulatoire, mais est absent dans les follicules primordiaux chez la ratte, la souris et l'humain (McGrath et al., 1995; Aaltonen et al., 1999; Elvin et al., 1999; Hayashi et al., 1999). Chez les espèces bovine et ovine par contre, le GDF-9 peut être détecté dans les follicules primordiaux et est présent dans les ovocytes à tous les stades ultérieurs du développement folliculaire (Bodensteiner et al., 2000; Pannetier et al., 2004). Le GDF-9 agit via des récepteurs sérine-thréonine kinase et est fortement exprimé dans les follicules secondaires. La forte expression de la protéine GDF-9 dans les ovocytes de follicules primaires suggère son rôle important dans la régulation de la croissance précoce du follicule et de l'ovocyte (Jaatinen et al., 1999; Lonergan et al., 2003). Toutefois, le recrutement thécal peut se produire indépendamment du GDF-9, mais la différenciation des cellules thécales est bloquée (Wu et al., 2004). Le GDF-9 semble agir indirectement pour contrôler la prolifération précoce des cellules de la granulosa et le recrutement des cellules thécales *in vivo* (Wu et al., 2004).

Basé sur sa séquence homologue à celle du GDF-9 et des autres protéines de la superfamille des TGF- $\beta$ , le gène GDF-9B (Aaltonen et al., 1999), aussi nommé le «

*Bone Morphogenetic Protein-15* » (BMP-15; Dubé et al., 1998), a été identifié.

L'expression du GDF-9B/BMP-15, comme celle du GDF-9, est restreinte à l'ovocyte à partir des stades de follicules primaires et au-delà (McGee & Hsueh, 2000; Findlay et al., 2002). Une mutation naturelle liée au chromosome X chez la brebis identifie le BMP-15 comme un facteur essentiel pour la fertilité chez la femelle (Galloway et al., 2000). Le GDF-9 et le BMP-15 sont deux facteurs absolument essentiels pour la folliculogénèse normale et la fertilité (Aaltonen et al., 1999; Otsuka et al., 2000; Erickson & Shimasaki, 2001; Lonergan et al., 2003).

Il a été récemment démontré que le facteur de transcription FoxO3a (Hillion et al., 1997) est un régulateur et un suppresseur crucial de l'activation folliculaire (Castrillon et al., 2003). Les souris chez lesquelles FoxO3a est absente (FoxO3a<sup>-/-</sup>) montrent une activation massive des follicules primordiaux. Ces derniers peuvent être considérés comme étant dans un stade d'arrêt développemental et pour maintenir cet arrêt, FoxO3a est apparemment nécessaire (Brenkman & Burgering, 2003). FoxO3a fonctionne aux premiers stades de la croissance folliculaire et les souris femelles FoxO3a<sup>-/-</sup> présentent un phénotype ovarien d'activation folliculaire menant à la mort de l'ovocyte, à un épuisement précoce des follicules ovariens fonctionnels et secondairement à l'infertilité (Castrillon et al., 2003).

### **2.2.2. Recrutement cyclique**

Chez les primates comme chez les animaux domestiques, la FSH est l'hormone impliquée dans le recrutement cyclique (Driancourt & Gougeon, 1999). Un follicule est recruté lorsqu'il est capable de répondre à la stimulation provoquée par les gonadotropines (Enuyer, 2000). Le recrutement cyclique est apparemment un

mécanisme aléatoire où seuls sont recrutés les follicules atteignant une taille adéquate au moment propice (Roche & Boland, 1991). La « *Gonadotropin Releasing Hormone* » (GnRH; Seeburg & Adelman, 1984; Adelman et al., 1986) ou gonadolibérine est le régulateur principal de la fonction reproductive. Elle est synthétisée et libérée par les neurones de l'hypothalamus et provoque la synthèse et la libération des hormones gonadotropes, FSH et LH, à partir des cellules de l'hypophyse antérieure. Le recrutement cyclique se définit par l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules sains et gonadotropine-dépendants (Driancourt, 2001). Un follicule gonadotropine-dépendant est un follicule qui a dépassé le stade auquel habituellement la plupart des follicules deviennent atrétiques (Fortune, 1994). Chez la vache, la taille folliculaire à laquelle apparaît la dépendance aux gonadotrophines est d'environ 3 mm (Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996).

Le développement folliculaire évolue sous la forme de vagues représentées par des périodes successives de croissance et de régression de plusieurs follicules (Ireland & Roche, 1982; Ireland, 1987). Une vague de croissance consiste en l'émergence, tous les sept ou neuf jours environ, de plusieurs follicules de diamètre égal ou supérieur à 3 mm parmi lesquels sera sélectionné le follicule dominant. Chaque vague folliculaire est précédée par un pic circulatoire de la FSH (Rombauts et al., 1998; Webb et al., 2003). La FSH est l'hormone clé stimulant l'émergence des vagues de follicules. La baisse de sa concentration est associée à la sélection du follicule dominant qui devient dépendant de la LH pour sa croissance finale (Roche, 1996). Le follicule dominant supprime la libération de la FSH par ses sécrétions d'E2 et d'inhibine (Donadeu & Ginther, 2003). Chez la vache, les dynamiques du follicule

ovarien durant les cycles œstraux normaux sont caractérisées par la présence de deux ou de trois vagues folliculaires par cycle (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Driancourt et al., 1991a). Des études ont toutefois révélé la prédominance d'une activité folliculaire à trois vagues par cycle œstral (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Noseir, 2003). Les deux ou trois vagues de l'activité folliculaire qui se développent durant le cycle œstral bovin émergent approximativement à 0, 9 et 16 jours après l'ovulation et sont nommés vagues 1, 2 et 3 respectivement (Kulick et al., 2001). Chaque période de vague de croissance folliculaire est subdivisée en trois phases. D'abord, une phase de recrutement des follicules qui est suivie par une phase de sélection folliculaire. Cette dernière résulte en la sélection d'un seul follicule qui poursuivra son développement. Enfin, la phase de sélection est suivie d'une phase de dominance folliculaire (Goodman & Hodgen, 1983; Lussier et al., 1994; Driancourt, 2001). L'initiation de la première vague de croissance folliculaire est détectée par échographie à un diamètre folliculaire de 3 à 4 mm, 24 à 72 heures après le début de l'œstrus (Savio et al., 1988; Ginther et al., 1996; Bao et al., 1998; Bao & Garverick, 1998). Tous les follicules gonadotrope-dépendants présents dans les ovaires entrent alors en croissance terminale dans le groupe de follicules recrutés. Ils forment une cohorte qui comprend plusieurs follicules de tailles et de sensibilités aux gonadotropines différentes. Ils vont évoluer séquentiellement soit vers l'ovulation, soit vers l'atrésie dans plus de 99 % des cas. À mi-phase folliculaire, une sélection se produit et la taille de la cohorte est réduite au nombre d'ovulation caractéristique de la race ou de l'espèce.

Le follicule dominant présent au début de la lutéolyse devient le follicule ovulatoire et l'émergence de la prochaine vague est supprimée jusqu'au jour de l'ovulation. Sous l'action de la P4 produite par le corps jaune, les follicules dominants des vagues successives subissent l'atrésie. Le corps jaune commence à régresser au jour 16 (dans le cas des vaches à deux vagues) ou au jour 19 (dans le cas de trois vagues). La prostaglandine F<sub>2</sub> alpha (PGF<sub>2</sub>α), originaire de l'endomètre, est l'agent lutéolytique naturel qui met fin à la phase lutéale du cycle œstral et permet l'initiation d'un nouveau cycle en absence de fécondation (Behrman, 1979; Pate, 1994, 2003). Les vagues caractéristiques de la croissance folliculaire observées durant le cycle œstral des mammifères sont associées à des changements morphologiques et fonctionnels dans les cellules de la granulosa et de la thèque. Elles sont aussi associées à des changements dans la vascularisation et le système nerveux du follicule en développement (Armstrong & Webb, 1997). De plus, ce modèle de développement folliculaire est associé à des changements dans l'expression d'ARNm codant pour les récepteurs des gonadotropines (Xu et al., 1995a) et des enzymes stéroïdogéniques (Xu et al., 1995b). Seuls les follicules qui atteignent la taille d'environ 2 mm en temps opportun poursuivent leur développement. Il s'agit alors de la croissance terminale des follicules qui est dépendante des gonadotropines.

La FSH et la LH sont des facteurs trophiques importants pour la prolifération et la survie des cellules somatiques folliculaires et pour le recrutement cyclique des follicules antraux. En effet, la suppression des gonadotropines dans le sérum après hypophysectomie chez la ratte mène à l'atrésie et à l'apoptose des follicules en développement (Nahum et al., 1996). Chez la vache, au-delà d'un diamètre d'environ

3-4 mm, le recrutement et le développement folliculaires dépendent d'une concentration adéquate de la FSH circulante (Lussier et al., 1994). Le principal effet de la FSH est d'induire l'activité de l'aromatase à l'intérieur des cellules de la granulosa expliquant l'habileté des follicules à produire l'E2. Suite au recrutement cyclique, la FSH stimule la production de l'inhibine et de la follistatine (Knight, 1996; Singh & Adams, 1998) et entraîne la perte de l'expression du gène codant pour l'« *IGF Binding Protein-2* » (IGFBP-2; Armstrong et al., 1998). Les IGFBP, dont l'IGFBP-4, inhibent la prolifération et la différenciation cellulaire stimulées par l'IGF-1 et réduisent la potentialisation par l'IGF-1 de l'action de la FSH sur les cellules de la granulosa. Ceci suggère que les variations des quantités des IGFBP dans les follicules individuels contribuent à la régulation du recrutement et au renouvellement des follicules ovariens (Roberts & Echterkamp, 2003).

Les IGF (voir section 2.6.2.1) et la follistatine (Ueno et al., 1987b; Houde et al., 1994; Tortoriello et al., 2001), localement produits dans l'ovaire, peuvent moduler le recrutement cyclique. Après l'administration d'hormone de croissance exogène, il y a une augmentation des concentrations d'IGF circulantes et une augmentation du nombre de follicules recrutés par vague folliculaire (Gong et al., 1991). De plus, une immunisation active contre la follistatine résulte en l'augmentation du nombre de follicules dans la cohorte de follicules recrutés (Singh et al., 1999). Ainsi, la follistatine peut avoir une action négative alors que les IGF ont une action positive sur la taille de la cohorte des follicules recrutés. Les inhibines (Mason et al., 1986; Burger et al., 1988) et les activines (Ferguson et al., 1998; Mellor et al., 2000), produits dans l'ovaire (Massagué, 1990), agissent aussi comme

co-régulateurs de la folliculogénèse. Inhibines, activines et follistatine fonctionnent comme des molécules régulatrices intraovariennes impliquées dans la prolifération des cellules du follicule, la stéroïdogénèse, la maturation de l'ovocyte et plus tard, dans la fonction du corps jaune (Knight & Glister, 2001). L'activine entraîne une stimulation de la prolifération des cellules de la granulosa, de l'expression des récepteurs à la FSH (FSHr; Minegishi et al., 1991; Griswold et al., 1995; O'Shaughnessy et al., 1996) et de l'expression du CYP19. La follistatine peut bloquer chacune de ces réponses induites par l'activine en se liant avec une affinité élevée à l'activine pour empêcher sa liaison à ses récepteurs (Lin et al., 2003).

Le gène « *Wilms' Tumor* » (WT1; Huang et al., 1990; Rose et al., 1990) supprime l'expression de plusieurs facteurs de croissance et leurs récepteurs dans différents types cellulaires (Rauscher, 1993). Le WT1 est un facteur de transcription à doigts de zinc et présente, chez la ratte, une expression très élevée dans les cellules de la granulosa des follicules primaires (Hsu et al., 1995). Cette expression diminue graduellement dans les follicules secondaires puis deviennent négligeables dans les follicules antraux et préovulatoires (Hsu et al., 1995). Des études *in vitro* ont démontré que le WT1 réprime les activités des promoteurs de l'inhibine-alpha et du FSHr, des marqueurs essentiels du développement folliculaire (Hsu et al., 1995).

### **2.3. Sélection du follicule dominant**

La phase de sélection représente l'émergence du follicule dominant parmi les follicules recrutés. Le mécanisme de la sélection implique d'abord une baisse des concentrations de la FSH après avoir atteint des taux nécessaires pour le recrutement et par la suite, un changement de la réponse du follicule dominant vis-à-vis de la LH.

Néanmoins, les mécanismes endocriniens et moléculaires exacts impliqués dans la sélection d'un follicule dominant chez la vache demeurent à être définis (Sartori et al., 2001). Le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'E2 et aussi d'inhibine (Driancourt et al., 1991b). Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur la production hypophysaire de la FSH provoquant sa diminution (McLachlan et al., 1987). Dès que la concentration en FSH circulante devient inférieure à celle induisant le recrutement, les follicules recrutés entrent en atresie (Driancourt et al., 1991b) à l'exception du seul follicule sélectionné. Il s'agit d'une sélection négative menée par le follicule sélectionné pour devenir dominant contre les follicules subordonnés.

La sélection du follicule dominant à partir du groupe de follicules antraux en croissance est un processus dynamique contrôlé par des interactions de facteurs intraovariens et des gonadotropines (Austin et al., 2001). Ainsi, les changements intrafolliculaires précoces qui distinguent un follicule destiné à devenir dominant parmi d'autres follicules d'une cohorte en croissance sont l'amélioration de sa capacité à produire l'E2 et le maintien de faibles niveaux des protéines de liaison aux IGF (IGFBP; Austin et al., 2001). De plus, des facteurs atréogéniques produits par le follicule dominant ont été suggérés pour expliquer la perte de développement des follicules subordonnés après l'administration de gonadotropines exogènes (Gougeon & Testart, 1990). La croissance rapide du follicule sélectionné entraîne la production de concentrations élevées de facteurs de croissance autocrines et paracrines, en particulier les IGF. Ces derniers stimulent l'augmentation de la vascularisation et la réaction à la FSH, ce qui constitue un mécanisme local de sélection positive.

Il est connu que la biodisponibilité des IGF, en l'occurrence l'IGF-1, stimule positivement la prolifération des cellules de la granulosa et la stéroïdogénèse participant ainsi à la sélection du follicule dominant (Monget et al., 2002). L'augmentation de la biodisponibilité d'IGF-1 est favorisée par la dégradation de l'IGFBP-4 par la protéase « *Pregnancy-Associated Plasma Protein-A* » (PAPP-A; Lawrence et al., 1999; Fayad et al., 2004). La protéase PAPP-A appartient à la famille des métalloprotéinases de type metzincin. Sa production est stimulée par la FSH et résulte en l'augmentation de la biodisponibilité de l'IGF-1. Dans les follicules atrophiques, l'augmentation d'IGFBP-2 participe à réduire la dégradation de l'IGFBP-4 et réduit conséquemment les quantités d'IGF-1 disponibles (Monget et al., 2002). Des données *in vivo* (Rivera & Fortune, 2001) ont montré que la protéolyse de l'IGFBP-4 est plus élevée dans le follicule sélectionné pour devenir dominant comparé aux follicules subordonnés les plus larges.

La fonction physiologique de PAPP-A reste à être clairement identifiée mais les données disponibles confirment l'hypothèse que l'expression de la protéase PAPP-A puisse jouer un rôle en contrôlant la survie, la croissance et/ou la différenciation des follicules. La co-expression de PAPP-A, de l'aromatase et des récepteurs à la LH dans les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires suggère que PAPP-A puisse être considérée comme un marqueur du développement folliculaire. Un rôle clé de cette protéase dans la sélection du follicule dominant a été démontré en utilisant un modèle expérimental qui produit deux follicules dominants sous l'action de la FSH exogène (Rivera & Fortune, 2001). Les follicules co-dominants induits dans ce modèle ont une activité protéolytique dirigée contre

l'IGFBP-4 similaire au cas d'un seul follicule dominant des cycles non stimulés. Ce résultat suggère que la sélection folliculaire implique une protéase dépendante de la FSH et dirigée contre l'IGFBP-4. L'activité protéolytique contre l'IGFBP-4 dans les follicules dominants est observée dès le deuxième jour de la première vague folliculaire suggérant un rôle de PAPP-A dans l'établissement de la dominance folliculaire ovarienne chez l'espèce bovine et possiblement chez les autres mammifères (Rivera et al., 2001). Durant le développement folliculaire, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de PAPP-A dans les cellules de la granulosa se produit seulement chez certaines espèces indiquant que d'autres protéases ou inhibiteurs de protéases peuvent être impliqués dans la dégradation des IGFBP (Spicer, 2004).

Présentement, une seule protéase avec une homologie globale à PAPP-A, spécifique à l'IGFBP-5, et nommée PAPP-A2 a été décrite (Overgaard et al., 2001; Laursen et al., 2002). Le système protéolytique dirigé contre l'IGFBP-5 est actif dans le follicule dominant mais non dans les follicules subordonnés de la même cohorte (Rivera & Fortune, 2003a). La protéase PAPP-A a aussi une contribution significative dans la protéolyse de l'IGFBP-5. Des expériences sur l'activité de ces protéases par l'incubation des différentes IGFBP avec du liquide folliculaire de follicules préovulatoires indiquent que seules les IGFBP-4 et -5 sont dégradées et non les IGFBP-2 et -3 (Rivera & Fortune, 2003a). L'augmentation de la protéolyse des IGFBP-4 et -5 précède clairement la sélection morphologique du follicule dominant ainsi que l'augmentation d'E2 intrafolliculaire (Rivera & Fortune, 2003b). L'augmentation de l'expression de la protéine PAPP-A favorise une très forte

dégradation des IGFBP-4 et -5 dans le futur follicule dominant libérant plus d'IGF pour agir en synergie avec la FSH et augmenter la production d'E2. L'amélioration des concentrations circulantes d'E2 entraîne, par rétro-contrôle négatif sur l'hypophyse, une baisse des concentrations de la FSH et limite ainsi la croissance des follicules subordonnés pour les destiner à l'atrésie. Le mécanisme de sélection du follicule dominant serait donc basé sur une réponse différentielle des follicules à l'intérieur d'une vague vis-à-vis de la FSH et de la LH (Ginther et al., 1996).

Deux aspects majeurs sont à signaler en ce qui concerne la sélection folliculaire. D'abord, le temps de la sélection, défini comme le moment de divergence entre les profils de croissance du follicule dominant et des follicules subordonnés, coïncide avec la première baisse significative des concentrations de la FSH. Le deuxième aspect concerne le changement de la réponse à la LH. La montée transitoire de la concentration en FSH permet une croissance folliculaire suffisante de sorte que certains follicules acquièrent une plus grande réponse à la LH leur permettant de survivre sans la FSH. Chez la vache, la LH est critique pour la croissance des follicules au-delà de 7 mm de diamètre (Gong et al., 1997). Chez toutes les espèces, les follicules sélectionnés apparaissent être les premiers à développer des LHR sur leurs cellules de la granulosa comparés aux follicules atrétiques (Evans & Fortune, 1997). Un événement éminent dans la sélection du follicule chez les espèces monoovulatoires serait la déviation du profil de croissance du follicule sélectionné par rapport à celui des follicules subordonnés (Ginther et al., 2001). Au début de la déviation, seul le follicule le plus largement développé est capable d'utiliser les

faibles concentrations de la FSH et devient le seul follicule impliqué dans la réponse aux gonadotropines (Kulick et al., 2001).

De façon générale, deux théories sont proposées pour expliquer les mécanismes impliqués dans la sélection d'un follicule dominant. Dans la première théorie, la sélection est contrôlée seulement par des mécanismes endocriniens à savoir la réduction de la FSH. La deuxième théorie ou théorie locale (Driancourt & Gougeon, 1999) stipule qu'il y a une production de composés par le plus large follicule de la cohorte qui inhibent directement le développement des autres follicules. Chez l'espèce bovine, espèce avec un contrôle strict du nombre d'ovulation, les deux mécanismes peuvent opérer (Driancourt, 2001). La sélection de certains follicules pour atteindre l'ovulation plutôt que l'atrésie repose donc sur le principe de coexistence d'un stade bien précis du développement de ces follicules associé à une concentration appropriée des gonadotropines sériques et des stéroïdes. En résumé, le contrôle du développement et de la sélection du follicule ovulatoire se produirait en trois étapes. En premier lieu, les gonadotropines initient la croissance folliculaire, puis le follicule sélectionné produit des facteurs de croissance qui suppriment le développement des autres follicules par des mécanismes dépendants des gonadotropines. Enfin, des facteurs à l'intérieur du follicule sélectionné favorisent les actions des gonadotropines.

#### **2.4. Établissement de la dominance folliculaire**

La dominance folliculaire fait suite à la sélection et elle est morphologique et fonctionnelle (Lavoir & Fortune, 1990). Elle est qualifiée de morphologique du fait qu'elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire. Elle est

également fonctionnelle parce que le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression des follicules en croissance ou d'inhiber la croissance d'autres follicules (Ko et al., 1991; Thatcher et al., 1996; Webb et al., 1999) et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié (Gong et al., 1993).

Bien que la concentration de la FSH diminue, le follicule dominant se maintient car ses besoins en FSH sont réduits (Driancourt & Gougeon, 1999). Trois facteurs peuvent expliquer l'aptitude du follicule dominant à survivre dans un milieu pauvre en FSH (Driancourt et al., 1991b; Driancourt & Gougeon, 1999). Premièrement, l'acquisition des LHr sur la granulosa permet au follicule de transférer sa dépendance vis-à-vis de la FSH vers la LH qui est sécrétée abondamment en fin de phase folliculaire. Une telle hypothèse paraît valide chez les espèces bovine et ovine. En effet, chez la vache, la stimulation de la pulsativité de la LH en phase lutéale permet de maintenir la dominance du follicule de la première vague folliculaire de façon prolongée (Sirois & Fortune, 1988). Deuxièmement, les quantités de la FSH atteignant le follicule dominant peuvent être augmentées par un mécanisme local impliquant la vascularisation (Driancourt & Gougeon, 1999). La vascularisation accrue du follicule dominant pourrait être induite de façon paracrine par le « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF; Tischer et al., 1991; Poltorak et al., 1997) dont la production est stimulée par la FSH, la LH et l'IGF-1 (Garrido et al., 1993; Driancourt et al., 2001b). Finalement, l'amplification de la réponse cellulaire à la FSH et/ou à la LH est augmentée par un mécanisme autocrine impliquant l'IGF-1 (Driancourt & Gougeon, 1999). La concentration et les types d'IGFBP dans les follicules dominants sont réduits ce qui augmente la biodisponibilité d'IGF-1

(Monget & Monniaux, 1995). Puisque l'IGF-1 potentialise l'action de la LH sur la thèque et l'action de la FSH sur la granulosa, ce facteur de croissance pourrait contribuer au maintien du follicule dominant (Monget & Monniaux, 1995). De plus, le TGF- $\beta$  pourrait aussi être impliqué car l'ajout de TGF- $\beta$  à des cellules de la granulosa potentialise leur réponse à de faibles doses de la FSH mais pas à des doses élevées de cette hormone (Knecht et al., 1987).

Dans les follicules subordonnés, les quantités d'IGF-1 libres diminuent progressivement alors que celles d'IGFBP-2 augmentent (Beg et al., 2001). La baisse des concentrations intrafolliculaires d'IGF-1 et l'augmentation d'IGFBP-2 privent le follicule subordonné des effets trophiques de l'IGF-1 contribuant ainsi à l'arrêt de la croissance. Par contre, pour le follicule dominant, l'acquisition des LHr par la granulosa, associée à la sécrétion active de la LH, contribue à maintenir une concentration plus élevée en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans les cellules folliculaires participant à la croissance du follicule (Webb et al., 1992). Chez les vaches déficientes en récepteurs de l'hormone de croissance et qui montrent une production limitée d'IGF-1, la dominance ne se produit pas et les follicules sont arrêtés dans leur croissance à une taille de 8 mm de diamètre (Chase et al., 1998). Ceci indique que l'induction du LHr peut se faire, au moins partiellement, par l'intermédiaire de l'IGF-1. En fait, l'IGF-1 est capable, en synergie avec la FSH, d'agir sur l'expression de l'ARNm du LHr avec des réponses dépendantes de la dose et du temps (Hirakawa et al., 1999).

La dominance consiste finalement en une influence négative du follicule le plus évolué sur ses contemporains moins avancés dans leur croissance puisque le

follicule dominant continue de croître quelques jours encore après la sélection (Webb et al., 1999). L'établissement de la dominance de ce follicule dépend de l'augmentation de sa capacité à aromatiser en E2 les précurseurs d'androgènes issus de sa thèque interne et à produire de l'inhibine, stimulant ainsi sa propre croissance. Une caractéristique définissant le follicule dominant apparaît être sa grande capacité à produire de l'E2 (Fortune et al., 2001). Durant la phase de croissance du follicule dominant, il y a une augmentation progressive de la concentration de l'E2 ayant une diminution progressive durant la phase statique (Noseir, 2003). Cependant, la production d'E2 n'apparaît pas être pré-requise pour la dominance folliculaire. Le traitement de brebis avec des inhibiteurs d'aromatase, qui réduisent remarquablement la production d'E2 durant le milieu de la phase folliculaire, ne bloque pas le développement des follicules dominants (Benoît et al., 1992; Oussaid et al., 1999). L'administration de l'épostane, un inhibiteur de la synthèse des stéroïdes, n'empêche pas non plus le développement des follicules dominants (Webb et al., 1992).

La dominance folliculaire apparaît donc être contrôlée par un grand nombre de mécanismes agissant en concert. Ces mécanismes incluent, outre les altérations des concentrations de la FSH, la possible production locale de facteurs ovariens qui peuvent inhiber directement le développement des follicules subordonnés (Campbell et al., 1995). Dans ce sens, il a été suggéré que la dominance folliculaire et l'inhibition de la croissance des follicules subordonnés soient dues à la production par le follicule dominant du « *Follicle Growth Inhibitory Factor* » (FGIF; Armstrong & Webb, 1997). Le follicule préovulatoire subit une croissance et une maturation alors que les autres follicules complètent leur régression par l'atrésie sans qu'un nouveau

recrutement ne se produise (Driancourt, 2001). Il existe une relation directe entre la présence du follicule dominant et l'absence de recrutement, car la cautérisation du follicule dominant induit immédiatement le recrutement d'une cohorte de petits follicules (Driancourt, 2001). La dominance est établie lorsque tous les follicules subalternes ont arrêté de croître, lorsque la différence entre le follicule dominant et le plus gros follicule subordonné est supérieure à 2 mm et lorsque le follicule dominant a atteint un diamètre minimum de 8.5 mm (Mihm et al., 2000).

Lors de la phase de dominance, la principale gonadotropine devient la LH dont une action essentielle est la stimulation de la synthèse des androgènes dans les cellules thécales. La LH est ainsi généralement considérée comme l'hormone clé impliquée dans la croissance finale du follicule dominant. Le traitement de vaches avec un agoniste de la GnRH, qui supprime profondément les pulses de la LH, bloque la croissance folliculaire à la taille à laquelle les follicules deviennent dominants (8 à 9 mm) (Webb et al., 1999). De plus, chez la vache, le développement des LHr sur la granulosa coïncide étroitement avec le début de la dominance (Driancourt, 2001). L'augmentation des quantités d'IGF-1 causée par une augmentation de la protéolyse d'IGFBP-4 (voir section 2.3) ainsi que l'effet paracrine de l'inhibine produite à l'intérieur des cellules de la granulosa potentialisent l'action de la LH sur la production d'androgènes par la thèque interne (Wrathall & Knight, 1995).

Il a été démontré que la destruction d'un follicule dominant au début d'une vague de croissance folliculaire retarde la régression des follicules de taille inférieure. Lorsque le futur follicule dominant est éliminé au moment où la déviation commence (8.5 mm), le plus large follicule subordonné est converti en futur follicule dominant

(Ginther et al., 2002). La disparition du follicule dominant se traduit par une nouvelle augmentation de l'hormone FSH, ce qui permettrait aux seconds follicules de devenir dominants à leur tour (Fortune, 1994). Les événements impliqués dans cette conversion du follicule subordonné en futur follicule dominant sont, dans l'ordre : une augmentation de la concentration en FSH systémique, une élévation transitoire d'activine A dans le liquide folliculaire ainsi qu'une augmentation d'E2. Ce dernier événement est combiné à la restauration apparente d'un équilibre entre les concentrations d'IGF-1 libres et d'IGFBP-2 compatible à la croissance du follicule dominant (Ginther et al., 2002). En fin de vague, la destruction du follicule dominant entraîne un recrutement plus précoce des follicules lors de la vague suivante (Ko et al., 1991). Ces observations soutiennent un principe fondamental de la biologie reproductive selon lequel la FSH est obligatoire pour la formation du follicule dominant (Erickson & Shimasaki, 2001).

La FSH agit via des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. La liaison de la FSH à son récepteur active la protéine G qui stimule l'adénylate cyclase pour produire l'AMPc à partir de l'ATP (Conti, 2002; Richards, 2001a; Zeleznik, 2001a). L'AMPc active une protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) par sa liaison à la sous-unité régulatrice de la protéine kinase et la libération de la sous-unité catalytique. La protéine kinase ainsi activée se déplace vers le noyau où elle interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et les active par phosphorylation modulant ainsi la transcription de gènes spécifiques. Les actions causées par les hormones qui augmentent la concentration de l'AMPc peuvent se terminer de diverses façons dont l'hydrolyse de l'AMPc par les phosphodiésterases (Mehats et

al., 2002; Conti et al., 2003). La présence de ces enzymes hydrolytiques assurent un renouvellement rapide du signal constitué par l'AMPc. Par conséquent, elles assurent un arrêt rapide du processus biologique une fois que le stimulus hormonal est enlevé. Des inhibiteurs de la phosphodiesterase augmentent l'AMPc intracellulaire et stimulent ou prolongent l'action des hormones.

En plus de ses actions bien étudiées via la voie AMPc/PKA, la FSH stimule la phosphorylation de deux kinases étroitement reliées qui sont le « *Serum and Glucocorticoid-Induced Kinase* » (SGK; Waldegger et al., 1997) et la protéine kinase « *Akt* » encore appelée protéine kinase B (PKB; Staal, 1987; Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). La SGK est une cible en aval d'une cascade activée par la « *Phosphatidyl Inositol-Dependant Kinase 1* » (PDK1; Richards et al., 2002) qui est elle-même phosphorylée et activée par le « *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase* » (IP3-K; Otsu et al., 1991). Ces deux kinases, PDK1 et IP3-K, sont activées par l'IGF-1 et les voies de l'insuline à travers les petites protéines G de la famille Ras (Zhu et al., 2002). Les IP3-K génèrent des lipides inositols spécifiques impliqués dans la régulation de la croissance, la prolifération, la survie, la différenciation cellulaire et les changements du cytosquelette. Une des cibles des produits lipidiques de IP3-K les mieux caractérisées est la protéine kinase B ou *Akt*. De nombreuses études ont montré que la FSH agit, au moins partiellement, en amplifiant la voie de signalisation IP3-K/*Akt* (Gonzalez-Robayna et al., 2000; Johnson et al., 2001; Cunningham et al., 2003; Zeleznik et al., 2003; Nechamen et al., 2004).

## 2.5. La stéroïdogénèse

Le cholestérol constitue le principal substrat dans le processus de la stéroïdogénèse. Le cholestérol plasmatique est véhiculé par les lipoprotéines de faible densité (« *Low Density Lipoprotein* »-LDL) chez les espèces bovine, porcine et humaine (Savion et al., 1982; Tureck & Strauss, 1982; Soto et al., 1984). La synthèse des stéroïdes est réalisée en trois étapes. La première étape permet la conversion du cholestérol en progestagènes C21 : prégnénolone et progestérone. Deux enzymes sont impliquées dans la réalisation de cette étape à savoir le « *Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P450* » (P450scc ou CYP11A; John et al., 1984; Morohashi et al., 1984; Chung et al., 1986) et la « *3Beta-Hydroxysteroid Deshydrogenase* » (3 $\beta$ -HSD; Berubé et al., 1989; Rheaume et al., 1992; Bain et al., 1993). La CYP11A hydrolyse et clive le cholestérol en prégnénolone. Le complexe enzymatique composant la CYP11A est essentiellement exprimé dans les cellules de la thèque interne en phase folliculaire (Sasano et al., 1989). La 3 $\beta$ -HSD présente une double activité enzymatique avec une activité 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase et une activité  $\Delta^4$  -  $\Delta^5$  isomérase.

La transformation du cholestérol est réalisée dans la mitochondrie après avoir été transporté de la membrane externe vers la membrane interne de cet organelle par la protéine « *Steroidogenic Acute Regulatory Protein* » (StAR; Sugawara et al., 1995). L'ARNm de StAR est exprimé, chez l'espèce humaine, dans les cellules thécales de chaque follicule sain de diamètre égal ou supérieur à quatre mm à l'intérieur de la cohorte de follicules recrutés et sa concentration est contrôlée par l'AMPc (Sugawara

et al., 1995). Cependant, sans tenir compte du stade de la vague folliculaire, l'expression de l'ARNm de StAR augmente dans les cellules de la granulosa avec l'augmentation de la taille des follicules (Bao et al., 1998). Le transport du cholestérol par la protéine StAR semble être une étape limitante de la synthèse des stéroïdes. Dans les follicules antraux, la protéine StAR est localisée dans les cellules de la thèque et non dans les cellules de la granulosa même si l'ARNm de StAR est exprimée dans les cellules lutéinisées de la granulosa de certains follicules atrétiques (Bao et al., 1998). Un facteur de transcription qui peut être important dans le contrôle du gène StAR est le « *Steroidogenic Factor 1* » (SF-1; Oba et al., 1996). Les souris chez lesquelles le gène SF-1 a été invalidé n'expriment pas ou très faiblement l'ARNm de StAR (Frigeri et al., 2000). De plus, les souris « knockout » ont démontré que SF-1 avait des fonctions importantes dans le développement endocrinien incluant la différenciation des gonades et la fonction gonadotrope de l'hypophyse qui sont essentielles pour la reproduction (Parker et al., 1996). En fait, ces souris n'ont ni de glandes surrénales ni de gonades et meurent d'insuffisance surrénale (Parker et al., 1996, 2002). Des co-represseurs du SF-1 ont été identifiés tels que le « *Dosage Sensitive Sex Reversal Adrenal Hypoplasia Congenita Critical Region on the X Chromosome Gene 1* » (DAX-1) et WT-1 (Gurates et al., 2003). Ces protéines sont recrutées pour lier directement SF-1, inhibant l'interaction avec d'autres facteurs de transcription ou bloquant le recrutement de co-activateurs (Jorgensen & Nilson, 2001; Fowkes & Burrin, 2003). DAX-1 est donc un facteur clé dans la régulation de l'expression du gène StAR (Stocco et al., 2001) alors que les effets de WT1 sur la stéroïdogénèse ne sont pas totalement élucidés (Gurates et al., 2002). Toutefois, il a été suggéré que WT1 puisse activer l'expression de SF-1 et promouvoir très tôt la

gonadogenèse (Wilhelm & Englert, 2002). Un contrôle de la prolifération cellulaire et de la différenciation exercée par WT1 a été également rapportée chez la souris (Haber et al., 1991).

La deuxième étape de la synthèse des stéroïdes comprend la synthèse d'androgènes par conversion des stéroïdes C21 en C19. La prégnénolone et la progestérone sont transformées en androgènes sous l'action de deux enzymes, formant le complexe à cytochrome P450, 17 $\alpha$ -hydroxylase et la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD; Wu et al., 1993; Geissler et al., 1994; Adamski et al., 1995). La P450 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A) est exclusivement localisée dans les cellules de la thèque interne (Sasano et al., 1989; Tamura et al., 1992) et possède une double activité. D'abord, elle présente une activité oxydante (17 $\alpha$ -hydroxylase) permettant la conversion de la prégnénolone en 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone et de la progestérone en 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone. Ensuite, son activité lyase (C17-C20) permet le passage de la forme 17 $\alpha$ -hydroxylée en dihydroandrostérone ou en androstènedione. La 17 $\beta$ -HSD permet l'interconversion de la déhydroépiandrostérone en androstènediol (androgène thécal principal) et de l'androstènedione en testostérone (Hinshelwood et al., 1993). Chez la vache, la voie  $\Delta$ 5 est préférée pour la conversion de la prégnénolone en androstènedione par la 17 $\alpha$ -hydroxylase et la 3 $\beta$ -HSD (Fortune, 1986).

La troisième étape permet la synthèse d'œstrogènes grâce à l'activité de la CYP19 (Chen et al., 1986; Evans et al., 1986; Corbin et al., 1988; Hinshelwood et al., 1993) convertissant les stéroïdes C19 en C18. La CYP19 catalyse la conversion de

l'androstènedione en œstrone (E1) et de la testostérone en E2 qui est le principal œstrogène produit par le follicule. Il faut souligner que la 17 $\beta$ -HSD est capable de transformer l'œstrone en œstradiol.

Les hormones stéroïdiennes sont libérées dans la vascularisation systémique. Les œstrogènes exercent des effets locaux à l'intérieur de l'ovaire. Certains œstrogènes peuvent être métabolisés en des produits présumés inactifs et actifs comme les catécholœstrogènes (Zhu & Conney, 1998). Les enzymes 2-hydroxylase et 4-hydroxylase catalysent la formation des catécholœstrogènes à partir de l'E2 et donnent le 2-hydroxyœstradiol et le 4-hydroxyœstradiol pouvant se lier aux récepteurs des œstrogènes (Kuiper et al., 1997). Les œstrogènes sont obligatoires pour la folliculogénèse normale au cours du stade antral et pour le maintien du phénotype femelle des cellules somatiques à l'intérieur des ovaires (Britt & Findlay, 2002). Ils modulent plusieurs réponses intraovariennes dont la promotion de la folliculogénèse, l'augmentation de l'expression des récepteurs des gonadotropines par les cellules de la granulosa, l'augmentation de la formation de jonctions lacunaires par les cellules de la granulosa et l'augmentation de la synthèse des stéroïdes (Rosenfeld et al., 2001). De plus, les œstrogènes inhibent l'apoptose des cellules de la granulosa contrairement aux androgènes qui la promouvoient (Billig et al., 1993; Rosenfeld et al., 2001).

Les enzymes nécessaires pour la synthèse de l'E2, principale hormone produite par les follicules préovulatoires, sont réparties entre les compartiments des cellules de la granulosa et de la thèque, démontrant l'importance d'un développement coordonné des composants du follicule. La liaison de la LH à son récepteur sur les

cellules thécales stimule l'expression d'enzymes stéroïdogéniques à savoir la CYP11A et la 17 $\alpha$ -hydroxylase qui catalysent la synthèse des androgènes. Les androgènes diffusent à travers la membrane basale vers les cellules de la granulosa où la CYP19 les convertit en œstrogènes. Une étape régulatrice de l'action des œstrogènes dans l'ovaire peut se réaliser grâce à leurs récepteurs dans la mesure où ces derniers peuvent persister dans un statut subfonctionnel. Les coactivateurs peuvent aussi contrôler l'action des œstrogènes en agissant de concert avec les récepteurs à l'E2 (ER $\alpha$  et ER $\beta$ , voir section 2.6.1) pour induire la transcription de gènes répondant aux œstrogènes. Une troisième forme de régulation peut survenir dans le métabolisme des œstrogènes par des enzymes qui les transforment en métabolites actifs ou inactifs (Rosenfeld et al., 2001).

Les cellules thécales expriment constitutivement le récepteur à la LH (LHr) dont l'activation permet, entre autres, l'induction d'enzymes stéroïdogéniques. Le LHr appartient au groupe des récepteurs membranaires avec sept domaines hydrophobiques et couplé aux protéines G (McFarland et al., 1989). Une des voies de signalisation de la LH après sa liaison au LHr se fait par l'intermédiaire de l'AMPc selon le même processus que le FSHr après son activation (voir section 2.4). Dans les cellules de la granulosa et du cumulus, la LH lie le LHr suivi d'une activation de la protéine G stimulante (Gs; Sparkes et al., 1987a, 1987b; Blatt et al., 1988) activant l'adénylate cyclase associée à la membrane cellulaire. L'adénylate cyclase catalyse la production de l'AMPc à partir de l'ATP et l'augmentation des concentrations d'AMPc active les protéines kinases pour stimuler la stéroïdogénèse. Les voies de la

cyclooxygénase/lipoxygénase sont également stimulées menant à l'augmentation de la production de la P4 et des prostaglandines.

Un phénomène de désensibilisation du LHR dans les cellules folliculaires survient environ au milieu de la relâche préovulatoire de la LH. Cette désensibilisation résulte en la réduction du couplage du LHR actif à la protéine Gs ce qui a pour effet de réduire la production d'AMPc. Des études ont démontré que la  $\beta$ -arrestine 2 (Attramadal et al., 1992) possède la capacité de diriger la désensibilisation en se liant au LHR actif et en bloquant le site de liaison de la Gs sur le LHR (Mukherjee et al., 1999a, 1999b). La disponibilité de la protéine  $\beta$ -arrestine 2 est contrôlée par la petite protéine G appelée « *Adenosine Diphosphate (ADP)-Ribosylation Factor 6* » (ARF6; D'Souza-Schorey et al., 1995; Cavenagh et al., 1996; Mukherjee et al., 2000; Salvador et al., 2001). Ainsi, la  $\beta$ -arrestine 2 est séquestrée dans la membrane plasmique par l'ARF6 lorsque cette dernière est inactive puis est relâchée en réponse à l'activation de l'ARF6 suite à l'activation du LHR (Hunzicker-Dunn et al., 2002).

Lors de la sélection du follicule dominant, les ARNm du LHR et de la  $3\beta$ -HSD, initialement exprimés dans les cellules thécales, apparaissent dans les cellules de la granulosa (Bao et al., 1998). La  $3\beta$ -HSD catalyse la transformation de la prégnénolone en progestérone. Cependant, les ARNm de la CYP11A sont exprimés dans les cellules de la granulosa des follicules recrutés (< 9 mm) et des follicules dominants (> 9 mm). Les cellules de la granulosa des follicules recrutés peuvent donc convertir le cholestérol en prégnénolone mais n'assurent la conversion de la prégnénolone en progestérone que lorsque le follicule devient dominant (Bao et al.,

1998). En résumé, le FSHr et la CYP19 sont exclusivement localisés dans les cellules de la granulosa. Les ARNm de la P450 17 $\alpha$ -hydroxylase et de la protéine StAR sont détectés dans les cellules thécales alors que le LHr, la CYP11A et la 3 $\beta$ -HSD sont exprimés dans les cellules de la granulosa et de la thèque.

## **2.6. Rôle des hormones et des facteurs de croissance dans la folliculogénèse**

### **2.6.1. Actions des hormones**

La fonction ovarienne normale requiert une interaction complexe entre des facteurs synthétisés à l'hypothalamus (GnRH), l'hypophyse antérieure (FSH et LH) et l'ovaire (hormones ovariennes, facteurs de croissance). Il est devenu évident que des facteurs de survie sont utiles pour supporter le développement folliculaire. La FSH semble être le plus important facteur de survie pour les follicules antraux précoces. L'hypophyse et les hormones stéroïdiennes contrôlent la synthèse, le stockage et la libération d'hormones hypothalamiques à travers des mécanismes de rétrocontrôle. La GnRH produite à l'hypothalamus est libérée de façon pulsatile dans les vaisseaux portes perfusant l'hypophyse et est modulée par le statut endocrinien de l'animal. L'E2 augmente la fréquence pulsatile ainsi que la sensibilité de l'hypophyse antérieure à la GnRH. En réponse à la GnRH, l'hypophyse antérieure libère les hormones hétérodimériques FSH et LH qui influencent à leur tour l'activité sécrétoire de la GnRH par une courte boucle de rétrocontrôle. Une faible fréquence de la GnRH favorise la libération de la FSH alors qu'une fréquence élevée favorise la libération de la LH (Elvin & Matzuk, 1998).

De nombreux facteurs promouvoient la survie des cellules dans les follicules préovulatoires (Hsueh et al., 1994; Chun et al., 1994, 1995; Eisenhauer et al., 1995)

ce qui suggère qu'un chevauchement de cascades hormonales soit impliqué dans le développement des follicules à ce stade. La croissance des follicule implique la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque induites hormonalement. Cette croissance favorise les follicules à produire l'E2 et à augmenter leur sensibilité aux gonadotropines. L'E2 établit une boucle de rétrocontrôle positif sur l'hypophyse au cours de la phase folliculaire causant la relâche préovulatoire de la LH. L'E2 stimule aussi l'augmentation des LHr sur les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires nécessaires pour l'ovulation et la lutéinisation (Richards, 1994).

Plusieurs gènes exprimés dans les cellules de la granulosa semblent être contrôlés par l'E2 parmi lesquels on retrouve la cycline D2 (Richards, 2001a). La cycline D2 est une protéine du cycle cellulaire intervenant au cours de la phase G1 de la division cellulaire. Les souris n'exprimant pas la cycline D2 sont infertiles et ne démontrent que des follicules secondaires dû à un arrêt de la multiplication des cellules de la granulosa (Sicinski et al., 1996). Par ailleurs, les actions de l'E2 sont intimement liées aux actions de la FSH dans la folliculogénèse (Britt & Findlay, 2002). Généralement, les œstrogènes promouvoient directement la croissance folliculaire. Les ER $\alpha$  et ER $\beta$  des œstrogènes (Walter et al., 1985; Greene et al., 1986; Mosselman et al., 1996; Kuiper et al., 1996) se compensent mutuellement en cas d'absence de l'un ou l'autre pour permettre le développement des follicules matures. Les souris chez lesquelles ER $\alpha$  a été invalidé (ERKO) sont acycliques et infertiles (Couse & Korach, 1999). La folliculogénèse y est arrêtée au stade de follicules antraux. Les souris femelles avec une invalidation du ER $\beta$  (BERKO) présentent de

petits ovaires pouvant compromettre ou réduire leur fertilité mais ces souris ne sont pas infertiles (Krege et al., 1998). Ainsi, les souris ERKO présentent un arrêt de la folliculogénèse au début du stade antral précédant une augmentation de la prolifération des cellules de la granulosa alors que les souris BERKO ont des follicules antraux et peuvent ovuler (Krege et al., 1998). Une double invalidation du ER $\alpha$  et du ER $\beta$  a résulté en des souris infertiles suite à un arrêt du développement folliculaire (Couse et al., 1999; Dupont et al., 2000). Ces souris présentent un phénotype ovarien remarquablement distinct caractérisé par une perte d'ovocytes après la naissance et une re-différenciation des cellules somatiques restantes en cellules semblables aux cellules de sertoli (Couse & Korach, 2001).

Les voies de signalisation contrôlant la prolifération des cellules de la granulosa impliquent les protéines kinases cyclines-dépendantes (CDK; Ninomiya-Tsuji et al., 1991) qui sont activées après leur induction et leur liaison à des molécules spécifiques nommées cyclines. L'entrée en phase G1 du cycle cellulaire est contrôlée par l'induction de la cycline D qui présente trois isoformes (D1, D2 et D3; Tsujimoto et al., 1984; Inaba et al., 1992; Motokura et al., 1992). La cycline D lie la CDK4/6 qui est par la suite phosphorylée et activée par une kinase cycline H-dépendante, la « *CDK Activating-Kinase* »(CAK; Fisher & Morgan, 1994), pour assurer la progression du cycle cellulaire. Une fois activé, le complexe cycline/cdk active des kinases qui permettent la phosphorylation de facteurs de transcription contrôlant la synthèse d'ADN et la progression cellulaire de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire (Sheaff et al., 1997). Des cyclines et des CDK additionnelles complètent finalement le cycle cellulaire. L'entrée et la progression du cycle

cellulaire en phase G1 des cellules peuvent être bloquées par des inhibiteurs des CDK tels que le p27KIP1 et le p21CIP (Polyak et al., 1994; Toyoshima et al., 1994). Dans l'ovaire, l'E2, la FSH et la LH contrôlent l'expression de la cycline D2. Chez des souris hypophysectomisés, l'ARNm de la cycline D2 ainsi que la protéine sont augmentés dans les cellules de la granulosa par un traitement avec l'E2 ou la FSH (Robker & Richards, 1998). Une expression maximale de la cycline D2 est observée avec un traitement combiné de ces deux hormones (Robker & Richards, 1998). L'expression de la cycline D2 est élevée dans les cellules de la granulosa de follicules en croissance puis est réduite rapidement et de façon permanente par la relâche préovulatoire de la LH coïncidant avec l'augmentation de p27KIP1 et p21CIP (Robker & Richards, 1998).

### **2.6.2. Contrôle local de l'ovaire et du processus de la dominance**

Des systèmes régulateurs locaux sont présents dans l'ovaire et incluent les IGF, TGF- $\beta$ , FGF et l'EGF/TGF- $\alpha$ . Les facteurs de croissance interagissent avec les récepteurs de la surface cellulaire et initient une cascade d'évènements qui influencent la croissance cellulaire, le métabolisme, la différenciation et aussi la mort cellulaire.

#### **2.6.2.1. Les IGF**

Les IGF fonctionnent comme des modulateurs de l'action des gonadotropines dans les cellules et stimulent la prolifération et la différenciation des cellules thécales et de la granulosa. Les actions biologiques des IGF sont contrôlées par une famille de sept protéines distinctes de liaison des IGF (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, -6 et -7; Brinkman et al., 1988; Wood et al., 1988; Kiefer et al., 1991; Shimasaki et al., 1991;

Murphy et al., 1993; Allander et al., 1994; Oh et al., 1996). Les IGFBP sont produites par la plupart des tissus et sont observées dans la circulation et les compartiments extracellulaires (Kim et al., 1999). Des études de localisation cellulaire ont identifié les cellules de la granulosa comme les cellules ovariennes majeures concernées par l'expression et la production d'IGF-1 (Oliver et al., 1989; Spicer et al., 1993). L'E2 produite par le follicule amplifie la synthèse d'IGF-1 qui stimule à son tour l'aromatation des androgènes en œstrogènes. L'IGF-1 joue un rôle central dans l'axe reproducteur. Il est important pour la maturation sexuelle et la sécrétion des gonadotropines et agit de façon synergique avec les gonadotropines pour stimuler la croissance et la différenciation du follicule (Spicer & Echterkamp, 1995; Poretsky et al., 1999; Zulu et al., 2002). Une délétion du gène IGF-1 chez la souris entraîne le développement d'un phénotype ovarien caractérisé par un échec ovulatoire, d'où l'IGF-1 est absolument requis pour le développement folliculaire normal (Baker et al., 1996). Les IGF sont produits principalement par le foie mais aussi par plusieurs autres organes et sont présents dans le sérum et plusieurs tissus du corps (Murphy et al., 1987; Zulu et al., 2002). La libération des IGF à partir des IGFBP se réalise sous l'action de protéases spécifiques aux IGFBP, en particulier les « *Plasminogen-Associated Plasma Protein* » -A (PAPP-A) et -A2 (PAPP-A2; voir section 2.4). Les IGFBP sont des régulateurs physiologiques des actions des IGF en stimulant ou en inhibant leurs actions (Hossner et al., 1997).

Le récepteur de type 1 d'IGF (IGFR1; Flier et al., 1986; Ullrich et al., 1986) est exprimé dans les cellules de la granulosa des follicules du stade préantral au stade de follicules antraux (Armstrong et al., 2000). L'IGF-1 et l'IGFR1 sont exprimés

dans les follicules ayant une apparence saine et peuvent être des marqueurs pour la sélection folliculaire, d'autant plus que l'IGF-1 améliore la prolifération de plusieurs types cellulaires (Elvin & Matzuk, 1998). La liaison d'IGF-1 à son récepteur provoque de multiples cascades de signalisation impliquant la « *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase* » (IP3-K; Hu et al., 1993; Volinia et al., 1994; Stoyanov et al., 1995; Le Roith et al., 1995). La IP3-K génère des phosphoinositides qui activent les kinases dépendantes des phosphoinositides (*Phosphoinositides-dependant kinase*-PDK). Ces dernières phosphorylent et activent des protéines kinases B (PKB) qui induisent les réponses biologiques telle que la prolifération cellulaire.

Les concentrations d'IGF-1 libérées par le foie sont directement sous le contrôle de l'hormone de croissance (« *Growth Hormone* », GH; Niall et al., 1971; Sundstrom et al., 1996) dont des récepteurs sont présents à la surface des cellules hépatiques. La régulation de la synthèse de la GH est modulée par une famille de gènes qui incluent les facteurs de transcription comme le « *Pituitary-Specific Transcription Factor 1* » (PIT1; Sturm et al., 1993; Herr et al., 1988) et le « *Prophet of PIT1* » (PROP1; Wu et al., 1998; Nakamura et al., 1999). Les facteurs PIT1 et PROP1 contrôlent la différenciation des cellules hypophysaires en somatotrophes qui synthétisent et libèrent la GH. De plus, les « *Relaxin-Like Factor* » (RLF), encore appelés « *Leydig cell insulin-like factor* » (Adham et al., 1993; Burkhardt et al., 1994), ont été identifiés comme des membres de la superfamille des « *Insulin-Like Hormone* » à laquelle appartiennent les IGF. Les RLF sont produits dans les ovaires de différentes espèces par les cellules de la thèque et dans le corps jaune au cours du cycle œstral ainsi qu'au cours de la gestation (Ivell, 1997).

### 2.6.2.2. Les TGF- $\beta$

Les membres de la superfamille des TGF- $\beta$  semblent être des régulateurs clés de l'organisation ovarienne et du développement folliculaire à plusieurs stades de la folliculogénèse (Smitz & Cortvrindt, 2002). Contrairement aux IGF, les TGF- $\beta$  sont libérés sous forme latente qui ne lie pas avec affinité élevée le récepteur TGF- $\beta$ . L'étape limitante dans le contrôle de l'activité des membres des TGF- $\beta$  est donc la conversion de la forme latente en la forme active. La pro-TGF- $\beta$  est clivée par la furine pour produire la protéine TGF- $\beta$  biologiquement active (Dubois et al., 1995; Blanchette et al., 1997). Les facteurs de la famille des TGF- $\beta$  se lient aux récepteurs sérine/thréonine kinase de type 2 situés à la membrane cellulaire. Ces récepteurs de type 2 se lient aux récepteurs sérine/thréonine kinase de type 1 pour entraîner la phosphorylation des protéines Smad 2/3. Ces dernières contrôlent la transcription des gènes en aval en dimérisant avec le médiateur commun, la Smad 4 (Heldin et al., 1997). Le complexe subit une translocation dans le noyau où il contrôle la transcription des gènes ciblés en se liant aux cofacteurs transcriptionnels (Massagué et al., 2000). Un des membres des TGF- $\beta$ , la « *Mullerian Inhibiting Substance* » (MIS) encore appelée « *Anti-Mullerian Hormone* » (AMH; Cate et al., 1986; Picard et al., 1986) contrôle négativement la croissance des petits follicules. La MIS est un facteur de croissance et de différenciation produit par les cellules de la granulosa dans l'ovaire post-natal. Les souris déficientes en MIS présentent une augmentation du nombre de follicules en croissance suggérant que MIS joue un rôle important dans le contrôle des premiers stades du développement folliculaire (Durlinger et al., 1999).

### 2.6.2.3. Les FGF

Les « *Fibroblast Growth Factors* » (FGF) ont d'abord été isolés de la glande hypophysaire bovine puis à partir de testicules bovins (Ueno et al., 1987a). Les FGF existent sous au moins 12 formes (Goldfarb, 1996) et démontrent des fonctions angiogéniques et mitogéniques importantes supportant la croissance du follicule dominant (Evain-Brion, 1994; Berisha et al., 2000). L'expression de l'ARNm des FGF aussi bien que du VEGF et des IGF reste élevée dans les cellules lutéales durant le milieu de la phase lutéale (Schams & Berisha, 2004). Dans l'ovaire, les FGF seraient produits par les cellules de la granulosa et agissent, comme l'EGF (ci-dessous) et le VEGF (voir section 2.4), par l'intermédiaire des récepteurs tyrosine kinase (Botta et al., 2000). Dans ce système, la fixation du ligand induit une activité tyrosine kinase dans le domaine intracellulaire du récepteur.

### 2.6.2.4. L'EGF/TGF- $\alpha$

L'« *Epithelial Growth Factor* » (EGF) stimule l'activité mitotique de plusieurs types de cellules *in vivo* et *in vitro*. L'EGF exerce un effet prolifératif puissant sur les cellules de la granulosa (Savion et al., 1981; Jones et al., 1982) et particulièrement sur les cellules de la granulosa des follicules primaires et secondaires chez le porc (Morbeck et al., 1993) et le hamster (Roy, 1993). L'EGF procure un effet positif sur la maturation de l'ovocyte et du développement de l'embryon chez l'espèce bovine (Harper & Brackett, 1993). Toutefois, chez la vache, les récepteurs de l'EGF sont absents dans les cellules des follicules préantraux (Wandji et al., 1992). Le récepteur de l'EGF renferme une activité kinase intrinsèque caractéristique puisqu'elle entraîne la phosphorylation préférentielle des résidus de

tyrosine. Le « *Transforming Growth Factor alpha* » ( $TGF\alpha$ ), produit par les cellules de la thèque, se lie au récepteur de l'EGF pour exercer des effets agonistes. Le  $TGF\alpha$  stimule la prolifération des cellules de la thèque et des cellules de la granulosa (Skinner & Coffey, 1988) permettant de maintenir les cellules de la granulosa à un stade indifférencié (Lobb & Dorrington, 1993). Il provoque aussi une inhibition de l'activité stéroïdogénique des cellules de la thèque (Skinner et al., 1987).

## 2.7. Croissance et maturation ovocytaires

La croissance de l'ovocyte commence dès la vie fœtale, de façon irrégulière et incomplète. L'ovocyte atteindra son plein développement et une maturation complète au moment de l'ovulation. Le statut de l'ovocyte dépend de l'ambiance hormonale intrafolliculaire et en particulier du ratio androgènes/œstrogènes (McNatty et al., 1979). La croissance de l'ovocyte débute en même temps que la croissance du follicule lorsque celui-ci s'échappe de la réserve des follicules primordiaux. La croissance de l'ovocyte se produit alors que son noyau est bloqué au stade diplotène de la prophase de la première division méiotique (Fair & Crozet, 1999). Elle est initialement rapide puis évolue parallèlement à la croissance folliculaire et enfin se poursuit lentement en comparaison à la croissance folliculaire. En effet, à partir des premières étapes du stade antral, la croissance de l'ovocyte ralentit. Dès le début du développement de l'ovocyte, il s'établit des jonctions adhérentes et des jonctions perméables (*gap junctions*) qui interviennent pour des transferts de matériels entre l'ovocyte et les cellules folliculaires, ainsi que le passage de petites molécules. La croissance de l'ovocyte (et non l'acquisition de la compétence pour compléter la méiose) dépend de la communication, par l'intermédiaire des jonctions perméables,

entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa (Eppig et al., 1996). De ce fait, le rythme de croissance de l'ovocyte est directement lié au nombre de cellules de la granulosa qui lui sont associées (Herlands & Schultz, 1984). De plus, la phase de croissance de l'ovocyte est caractérisée par une activité transcriptionnelle intense et par l'accumulation de macromolécules (Fair & Crozet, 1999).

La maturation de l'ovocyte se produit dans le noyau, le cytoplasme et la membrane ovocytaires. L'ovocyte contenu dans le follicule mûr possède un noyau en prophase I et dont l'enveloppe est encore intacte. Ce noyau est appelé plus communément vésicule germinative (Lecomte, 1999a). Il va subir une maturation qui suit la relâche préovulatoire de la LH et qui couvre la période allant de la rupture de l'enveloppe nucléaire jusqu'à la métaphase de la deuxième division méiotique. Cet événement est connu sous le nom de « *Germinal Vesicle Breakdown* » (GVBD). La transcription puis l'expression de plusieurs gènes dans un ordre chronologiquement programmé permet à l'ovocyte de devenir compétent pour reprendre sa méiose (Szöllösi, 1991). En réponse à la stimulation hormonale (relâche de la LH), l'ovocyte complète la première division méiotique et s'arrête en métaphase 2. La reprise de la méiose est accompagnée par une augmentation de l'activité kinase cytosolique de l'ovocyte. Un composé pivot de cette activité est la cycline B-p34cdc2 aussi appelée « *Maturation Promoting Factor* » (MPF; Dekel, 1996). Le MPF est une protéine sérine/thréonine kinase impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et renferme deux sous-unités, la p34cdc2 et la cycline B.

Au cours de la folliculogénèse, le follicule renferme un ovocyte capable de reprendre spontanément sa méiose lorsqu'il est séparé du follicule. Cette observation

supporte l'hypothèse d'une inhibition d'origine folliculaire (Szöllösi, 1991; Lecomte, 1999b). Le follicule produirait une ou plusieurs substances appelées « *Oocyte Meiosis Inhibitor* » (OMI; Szöllösi, 1991) dont la nature reste incertaine bien que plusieurs candidats aient été proposés (Lecomte, 1999b). Ces inhibiteurs de la maturation ovocytaire sont sécrétés par les cellules de la granulosa (Tsafriri et al., 1982) et doivent transiter ou être transformés par les cellules du cumulus pour être efficaces (Szöllösi, 1991). L'AMPc semble jouer un rôle prépondérant dans le blocage et la reprise de la méiose chez de nombreuses espèces (Eppig et al., 1985; Lecomte, 1999a). L'inhibition de la maturation de l'ovocyte est due à la prévention de l'activation de la pré-MPF en absence de phosphorylation de la p34cdc2 et à la répression de la synthèse *de novo* de la cycline B. Suite au signal gonadotrope précédant l'ovulation ou lors de la mise en culture *in vitro* de complexes ovocytes-cumulus (COC), on assiste à de rapides modifications des jonctions entre les cellules du cumulus et l'ovocyte entraînant la levée de l'inhibition (Lecomte, 1999b). Cependant, il n'existe pas de récepteurs de gonadotropines sur l'ovocyte et il faut donc évoquer le rôle de facteurs paracrines venant des cellules de la granulosa ou de la thèque interne (Lecomte, 1999b). La relâche préovulatoire de la LH induit la reprise de la méiose possiblement par l'intermédiaire des cellules murales de la granulosa et des cellules du cumulus. La LH peut agir soit en éliminant le signal inhibiteur, en bloquant son transfert via les jonctions entre les cellules du cumulus et l'ovocyte ou en mettant fin à la production d'OMI.

La maturation nucléaire de l'ovocyte s'accompagne de changements dans la structure et l'organisation à la fois du cytoplasme et de la membrane de l'ovocyte

concerné. La migration des granules corticaux est sans doute le trait le plus marquant de la maturation cytoplasmique et contribue à éviter la polyspermie (Mermillod & Le Lannou, 1999). Les cellules de la granulosa et/ou les cellules ovocytaires vont induire l'acquisition par la zone pellucide de trois glycoprotéines, ZP1, ZP2 et ZP3. Ces dernières, en particulier la ZP3, constituent le facteur d'attachement du spermatozoïde à la zone pellucide, participent à l'induction de la réaction acrosomale, bloquent la polyspermie et jouent ainsi un rôle significatif dans la fécondation (Dean, 1992; Lecomte, 1999b). L'acquisition de cette spécificité chimique de la zone pellucide confère à l'ovocyte sa compétence membranaire pour la fécondation.

## **2.8. Rôle de l'ovocyte et des jonctions perméables**

Le complexe de communication bidirectionnelle entre chaque ovocyte et les cellules qui l'entourent est essentiel pour le développement coordonné aussi bien des cellules germinales que des cellules somatiques (Eppig, 2001; Matzuk et al., 2002). La communication ovocyte-granulosa assurée par des facteurs paracrines sécrétés ainsi que les jonctions perméables sont essentielles pour la progression développementale des follicules (Matzuk et al., 2002). Le rôle crucial de l'ovocyte dans le contrôle de la progression du développement folliculaire a été illustré dans les expériences d'échanges de cellules germinales et de cellules somatiques à différents stades du développement folliculaire (Eppig et al., 2002). L'ovocyte favorise la prolifération des cellules de la granulosa et leur différenciation. En retour, l'ovocyte dépend des cellules somatiques pour supporter sa croissance et son développement (Brower & Schultz, 1982), contrôler la méiose (Chesnel et al., 1994) et moduler l'activité transcriptionnelle globale dans le génome de l'ovocyte (De la Fuente &

Eppig, 2001). Bien que les mécanismes de sélection et d'activation des follicules primordiaux pour initier leur entrée dans la cohorte de follicules en croissance ne soient pas connus, l'ovocyte semble clairement jouer un rôle clé dans le développement au-delà du stade de follicule primaire (Eppig, 2001). L'action des facteurs produits par l'ovocyte sur les cellules qui l'entourent se fait par l'intermédiaire des jonctions perméables. La folliculogénèse ovarienne et la production d'ovocytes fertilisables dépendent donc des communications intercellulaires à l'intérieur du follicule en développement et du follicule mature (Kidder & Mhawi, 2002). Ces communications débutent au stade de follicules primordiaux et s'étendent sur toute la durée de la folliculogénèse à travers les stades de follicules préantraux et antraux (Mitchell & Burghardt, 1986).

Les ovocytes mammaliens produisent plusieurs facteurs au cours de la folliculogénèse qui incluent le GDF-9, le BMP-15 et aussi le récepteur *c-kit* exprimé à la surface de l'ovocyte (voir section 2.2.1). Le GDF-9 est obligatoire pour la croissance folliculaire au-delà du stade primaire (Erickson & Shimasaki, 2000) et son apparition est corrélée au recrutement des follicules primordiaux à partir du groupe de follicules en croissance. L'inactivation du gène GDF-9 résulte en une acyclicité et une infertilité des souris, associées à l'absence de follicules préovulatoires, d'ovulation et de gestation (Erickson & Shimasaki, 2000). Le GDF-9 facilite la formation et l'intégrité du COC en induisant entre autres, la « *Hyaluronan Synthase 2* » (HAS-2) et en supprimant l'« *Urokinase Plasminogen Activator* » (u-PA; Elvin et al., 2000; Varani et al., 2002). Le BMP-15 fonctionne de façon coopérative avec le GDF-9 pour maintenir l'intégrité du COC et maximiser la fertilité de la femelle (Yan

et al., 2001). Le contrôle de la biodisponibilité du BMP-15 dans l'environnement folliculaire apparaît être impératif pour le propre développement du follicule et pour l'ovulation (Otsuka et al., 2001). Par ailleurs, l'activité biologique du BMP-15 est inhibée par la formation extracellulaire d'un complexe inactif entre le BMP-15 et la follistatine (Otsuka et al., 2001).

Plusieurs protéines connexines sont présentes et impliquées dans les communications intercellulaires entre les ovocytes et les cellules folliculaires. De multiples sous-unités de connexines se combinent pour former le connexon, un arrangement hexagonal de six protéines servant comme canaux intercellulaires pour permettre le passage direct de molécules régulatrices et de petits métabolites (Yeager & Nicholson, 1996). La Connexine 43 (CX43; Arishima et al., 2002) est la connexine majeure des jonctions perméables dans l'ovaire chez les espèces bovine (Nuttinck et al., 2000), ovine (Grazul-Bilska et al., 1998), porcine (Lenhart et al., 1998) et murine (Mayerhofer & Garfield, 1995). La CX43 est observée dans les cellules de la prégranulosa dès le premier jour après la naissance lorsque les premiers follicules primordiaux sont formés (Juneja et al., 1999). L'invalidation du gène codant pour la CX43 résulte chez la souris en des femelles et mâles possédant très peu de cellules issues de la lignée germinale (Juneja et al., 1999). De plus, les cellules de la granulosa sont inaptes à proliférer en l'absence de la CX43 ce qui est conforme avec la présence de cette protéine dès le début de la folliculogénèse. Ces observations impliquent que soit la CX43 est la seule connexine exprimée dans les cellules de la granulosa des follicules primaires soit qu'elle joue un rôle indispensable qui ne peut

être compensé par d'autres connexines qui pourraient être présentes (Kidder & Mhawi, 2002).

Il est improbable que la CX32 (Scherer et al., 1995) puisse jouer un rôle important dans la folliculogénèse puisque les souris invalidées sont fertiles (Nelles et al., 1996). Par ailleurs, les souris n'ayant pas la CX37 (Reed et al., 1993) sont viables et la folliculogénèse ovarienne se déroule normalement jusqu'au dernier stade préantral. Cependant, les follicules matures ne se développent pas chez ces souris et l'ovulation ne peut être induite par une stimulation aux gonadotropines (Nelles et al., 1996). Simon et al. (1997) ont observé l'expression de la CX37 dans la jonction granulosa-ovocyte au moment où le follicule se développe vers le stade secondaire, alors que les follicules qui ont perdu la CX37 ne progressent pas normalement.

## **2.9. Ovulation et formation du corps jaune**

### **2.9.1. Le processus ovulatoire**

Précédent l'ovulation, les cellules de la granulosa réalisent la biosynthèse et la sécrétion d'œstrogènes. Les œstrogènes synthétisés par le follicule en phase de croissance terminale exercent une influence positive sur l'hypophyse qui produit une relâche des gonadotropines nécessaires à l'ovulation. En réalité, en fin de phase folliculaire, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle positif sur la libération hypophysaire de la LH et un contrôle négatif sur la FSH (Couzinet & Schaison, 1993). Une administration de doses d'E2 qui résultent en des concentrations supraphysiologiques dans la circulation a un effet biphasique sur la sécrétion des gonadotropines qui est d'abord inhibée avant une forte relâche (Kessner et al., 1981; Butler et al., 1983). Au cours de la phase d'évolution terminale, le follicule acquiert la possibilité de répondre

à la relâche préovulatoire des gonadotropines, principalement à la LH. Chez la vache, l'ovulation se produit 29 à 31 heures après la décharge préovulatoire de la LH. Chez les vertébrés, l'ovulation est comparable à une réaction inflammatoire (Espey, 1994) et plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans son contrôle (Bobe & Goetz, 2001). L'ovulation est un phénomène biologique complexe correspondant à la transformation méiotique de l'ovocyte. Il correspond aussi à un profond remaniement de la structure du follicule aboutissant à l'expulsion de l'ovocyte mature et fécondable (Driancourt et al., 1991b) puis à la formation d'un corps jaune. Son mécanisme, étudié par les travaux des dernières années, comporte divers changements morphologiques relevant de l'action d'enzymes dont l'élaboration dépend d'un contrôle neuro-endocrinien.

Au moment de l'ovulation, la maturation normale de l'ovocyte dépend du signal de transmission entre le cumulus et les cellules de l'ovocyte. L'intervalle de temps compris entre la relâche de la LH et l'ovulation permet des changements morphologiques et biochimiques indispensables pour le follicule et l'ovocyte qu'il contient. Cette cascade de modifications constitue pour le follicule le signal du déclenchement imminent de l'ovulation (Dieleman et al., 1983). Parallèlement à la maturation ovocytaire, la stéroïdogénèse folliculaire qui était majoritairement œstrogénique avant la relâche de la LH s'oriente vers une production préférentielle de la P4 après cette relâche (Hyttel et al., 1986). Chez la vache, la relation qui existe « *in vivo* » entre les cellules murales de la granulosa et le COC a été étudiée tout au long de la période préovulatoire (Eppig, 2001; Eppig et al., 2002). De plus, les cellules du cumulus entourant l'ovocyte produisent une matrice en réponse indirecte à la relâche préovulatoire de la LH. Cette réponse se fait par l'intermédiaire des prostaglandines

(Sirois & Richards, 1993; Espey et al., 2000) ainsi que du GDF-9 et du BMP-15 (Elvin et al., 1999, 2000; Yan et al., 2001). Les événements qui se produisent à l'intérieur du COC des follicules préovulatoires sont essentiels pour la formation de la matrice extracellulaire (EC) qui est nécessaire pour l'ovulation (Camaioni et al., 1996; Ochsner et al., 2003).

La matrice du COC renferme des composants majeurs qui sont l'acide hyaluronique (HA; Hess et al., 1999; Salustri et al., 1999) et au moins deux protéines de liaison à HA, le « *Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene 6* » (TSG-6; Lee et al., 1992; Fulop et al., 1997; Yoshioka et al., 2000; Ochsner et al., 2003) et le « *Serum-Derived Inter alpha-Inhibitor* » (I $\alpha$ I; Chen et al., 1992; Hess et al., 1999). Le facteur I $\alpha$ I provient du foie et est requis pour la formation de la matrice du cumulus oophorus (Zhuo et al., 2001; Zhuo & Kimata, 2001). La matrice renferme d'autres facteurs comme les membres des protéoglycans (McArthur et al., 2000; Russell et al., 2003a). Ces derniers sont des macromolécules composées de chaînes de glucosaminoglycans (GAG) liées de façon covalente à une protéine commune (Kjellén & Lindahl, 1991). Plusieurs protéoglycans ont l'habileté d'interagir avec les protéines de la matrice EC à travers leurs chaînes GAG ou par la protéine commune (Zhuo & Kimata, 2001). La dégradation des protéoglycans par plusieurs types de protéases participe à la réussite de l'ovulation et de la fécondation (Russell et al., 2003b).

La relâche préovulatoire de la LH déclenche une série de changements morphologiques à l'intérieur du follicule. Ces modifications incluent l'induction de plusieurs gènes dont la « *Prostaglandin G/H Synthase 2* » ou cyclooxygénase 2

(PGHS2/Cox-2; Hla & Neilson, 1992; Jones et al., 1993; Sirois & Richards, 1993; Sirois & Doré, 1997) ainsi que plusieurs protéases. L'induction de la PGHS2 par la LH est essentielle pour l'expansion du cumulus et l'ovulation. La PGHS2 est obligatoire pour la synthèse des prostaglandines notamment la prostaglandine E2 (PGE2). La PGE2 est impliquée dans un grand nombre d'évènements physiologiques et pathologiques dans plusieurs tissus. Les effets biologiques de la PGE2 sont réalisés suite à l'interaction avec des récepteurs de membrane spécifiques des prostanoïdes couplés aux protéines G dont le récepteur de type 2 de la PGE2 (EP2; Taketo et al., 1994).

Les prostaglandines (PG) sont produites à partir de l'acide arachidonique dérivé des phospholipides membranaires sous l'action de la phospholipase A2 (PLA2; Seilhamer et al., 1986; Ishizaki et al., 1999; Diaz et al., 2002). Les prostanoïdes sont communément associés à la réaction inflammatoire et aux réponses immunitaire et hormonale. Les PG de type E et F augmentent dans le follicule ovarien dès les premières heures du processus ovulatoire : elles atteignent une concentration maximale au moment de la rupture folliculaire et diminuent ensuite pour atteindre des taux d'expression comparables à ceux du follicule préovulatoire (Espey, 1994). L'augmentation de l'expression des PG est associée à une augmentation de la PGHS2 chez le rat (Wong & Richards, 1991; Sirois et al., 1992), la vache (Sirois, 1994), la jument (Sirois & Doré, 1997) et le singe (Duffy & Stouffer, 2001). Chez le rat, la vache et la jument, l'intervalle de temps entre l'induction de la PGHS2 et la rupture folliculaire est conservé. Toutefois, le temps d'induction de la

PGHS2 après la relâche ovulatoire de la LH varie entre ces espèces (Sirois & Doré, 1997).

Malgré le fait que les PG soient hydrophobes, elles exercent leurs actions par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. On reconnaît deux types de récepteurs selon la nature des seconds messagers. Le premier utilise l'AMPc comme second messager qui activera la PKA (Hansson et al., 2000). Dans le second cas, une protéine G stimule la phospholipase C qui transforme le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3; Troyer et al., 1986; Hansel et al., 1987). Le DAG stimule une protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle les groupes sérine et thréonine de plusieurs protéines cibles entraînant divers effets cellulaires. Quant au IP3, il diffuse dans le cytoplasme et se lie à un canal ionique dans des organelles riches en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tel que le réticulum endoplasmique. L'entrée du calcium dans la cellule cause divers effets biologiques par l'activation de la PKC ou de la protéine kinase  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline-dépendante (Rasmussen et al., 1984). La calmoduline ainsi liée au  $\text{Ca}^{2+}$  peut interagir avec plusieurs enzymes telle que la PGHS2 pour moduler leur activité (Coroneos et al., 1997; Mangat et al., 1997).

La LH induit également le récepteur à la progestérone (PR; Misrahi et al., 1987) qui est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le PR contrôle de nombreuses fonctions des tissus reproducteurs. Dans l'ovaire, la LH induit rapidement et sélectivement le PR dans les cellules murales de la granulosa des follicules préovulatoires (Park & Mayo, 1991; Natraj & Richards, 1993). La P4 ainsi que le PR jouent un rôle clé dans le processus ovulatoire (Lydon et al., 1995; Espey et

al., 2000; Robker et al., 2000). Les souris PR-/- (dont le PR a été invalidé) n'ovulent pas et il n'y a pas de lutéinisation en réponse à un stimulus ovulatoire (Lydon et al., 1995). Deux gènes, celui du « *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* » (PACAP; Hosoya et al., 1992) et de l'ocytocine (Brownstein et al., 1980), ont démontré une capacité à stimuler la production de la P4 (Einspanier et al., 1997; Lioutas et al., 1997; Gras et al., 1999; Ko & Park-Sarge, 2000; Park et al., 2000) suggérant que ces gènes forment une boucle de rétrocontrôle local avec la P4 durant la lutéinisation. Le PACAP aurait un rôle anti-apoptotique, une fonction conforme avec le rôle anti-apoptotique potentiel de la P4 dans les follicules préovulatoires (Svensson et al., 2000; Chaffin & Stouffer, 2000).

Le PR est obligatoire pour l'expression de deux protéases, la « *A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 1* » (ADAMTS-1; Kuno et al., 1997, 1999; Kuno & Matsushima, 1998; Vazquez et al., 1999) et la « *Cathepsin L* » (Joseph et al., 1988; Gal & Gottesman, 1988; Chauhan et al., 1993). ADAMTS-1 est un membre de la famille ADAM des métalloprotéinases et possède la capacité de dégrader la matrice EC en réponse au signal ovulatoire. La protéase ADAMTS-1 clive plusieurs membres des protéoglycans dont versican et aggrecan présents dans la matrice EC (Kuno et al., 2000; Sandy et al., 2001; Russell et al., 2003b).

L'expression de la protéase ADAMTS-1 est stimulée dans les cellules de la granulosa et dans le corps jaune chez la vache après une injection de la GnRH (Madan et al., 2003). En plus d'ADAMTS-1, deux autres membres de la famille ADAM, à savoir ADAMTS-4 et -5, peuvent également dégrader des membres des protéoglycans (Sandy et al., 2001; Vankemmelbeke et al., 2001; Westling et al., 2003). La

«*Cathepsin L* » démontre une activité protéolytique spécifique pour le collagène de type I et IV, l'élastine et la fibronectine composant la paroi folliculaire (Luck et al., 1995; Robker et al., 2000). Le phénotype d'anovulation observé chez les souris, dont le gène du PR a été invalidé, est associé à un défaut d'expression de ces deux protéases (Russell et al., 2003b).

La dégradation de la matrice EC, suite à la relâche de la LH, est un événement essentiel menant à l'expulsion de l'ovocyte. Du fait de la composition complexe de la matrice EC, plusieurs protéases avec des substrats spécifiques sont nécessaires pour son remodelage et sa dégradation. Ces enzymes sont aussi impliquées dans la dégradation du réseau des fibres protéiques extracellulaires qui assurent la structure de la paroi folliculaire. L'activateur du plasminogène (PA; Jorgensen et al., 1982; Salerno et al., 1984) est un de ces facteurs qui a été associé à la rupture folliculaire (Beers, 1975; Strickland & Beers, 1976). Le PA est une sérine protéase produite par les cellules de la granulosa et de la thèque du follicule préovulatoire en réponse à la LH (Chun et al., 1992; Tsafiriri, 1995; Tsafiriri & Reich, 1999). Elle est impliquée dans la décomposition de la matrice extracellulaire et dans la rupture de la paroi folliculaire menant à l'ovulation. Un blocage pharmacologique de l'action de ces protéases entraîne une réduction du taux d'ovulation (Tsafiriri & Reich, 1999). L'activité de la protéase PA est contrôlée spécifiquement et rapidement par l'intermédiaire d'inhibiteurs du PA (PAI; Ginsburg et al., 1986; Ny et al., 1986; Antalis et al., 1988). Ces inhibiteurs de protéases sont synthétisés par les cellules de la granulosa et de la thèque suivant la stimulation à la LH/hCG (Politis et al., 1990). Chez les singes, un traitement à l'hCG a entraîné une augmentation de la quantité de

tPA dans les follicules préovulatoires ainsi qu'une stimulation de la production de PAI de type 1 (Liu et al., 2004). Cette expression coordonnée de tPA et PAI-1 est importante pour l'ovulation. De plus, les métalloprotéinases, famille multigénique de protéinases zinc-dépendantes, seraient aussi impliquées dans la dégradation de la matrice EC (Robker et al., 2000). Elles sont synthétisées et sécrétées sous forme d'enzymes latentes dans l'espace extracellulaire où elle seront activées par d'autres protéases. L'action protéolytique des métalloprotéinases de la matrice est modérée par les « *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase* » (TIMP; Docherty et al., 1985; Stetler-Stevenson et al., 1989; Apte et al., 1994; Greene et al., 1996).

### **2.9.2. La formation du corps jaune**

Suivant la rupture du follicule et la libération de l'ovocyte, les cellules de la granulosa et de la thèque se différencient en cellules lutéales contribuant à la formation du corps jaune (*corpus luteum*; CL). Chez toutes les espèces de ruminants et chez d'autres mammifères, le CL exerce une fonction essentielle dans la régulation du cycle œstral. Il joue, en plus, un rôle déterminant dans la mise en place et le maintien de la gestation. En absence de fécondation, le CL régresse spontanément après une période plus ou moins longue suivant les espèces. En cas de fécondation, le CL assure le maintien de la gestation et est alors qualifié de corps jaune gestatif. La principale hormone sécrétée par le CL est la P4 et il produit aussi l'ocytocine en fin de phase lutéale (Brownstein et al., 1980) et la relaxine en fin de gestation (Hudson et al., 1981, 1984). Toutefois, les cellules stéroïdogènes du CL se multiplient peu ou pas du tout suivant l'ovulation de sorte que la qualité de la fonction lutéale dépend grandement de l'état du follicule qui lui a donné naissance et de l'environnement

hormonal dans lequel celui-ci s'est développé (Leymarie & Martal, 1991). Le contrôle de la sécrétion de la P4 en dehors de la gestation est assuré par des hormones d'origine hypophysaire, notamment la LH. Ce contrôle est également assuré par une substance lutéolytique d'origine utérine bien identifiée, la prostaglandine F2 alpha (PGF2 $\alpha$ ; Leymarie & Martal, 1991; Pate, 1994). Cette dernière occasionne la sécrétion de l'ocytocine qui, à son tour, favorise la libération de la PGF2 $\alpha$ . L'établissement de cette boucle de contrôle positive assure la lyse du CL.

La régression du CL consiste en une réduction de la production de la P4 (régression fonctionnelle) et en la mort cellulaire (lutéolyse). La lutéolyse est irréversible et résulte de signaux qui initient la mort cellulaire (voir section 2.10) pour assurer le maintien de la cyclicité ovarienne. Il est généralement accepté que chez plusieurs espèces, la lutéolyse est initiée par la PGF2 $\alpha$ . Le récepteur de la PGF2 $\alpha$  est un récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G. En se liant à son récepteur, la PGF2 $\alpha$  induit la lutéolyse au niveau cellulaire via l'inhibition de la formation d'AMPc stimulée par la LH. Toutefois, la destruction des cellules lutéales durant la lutéolyse ne se produit pas simultanément dans toutes les cellules. Les petites cellules d'origine thécale et les cellules endothéliales sont les premières cellules à diminuer en nombre suivi par une réduction des larges cellules issues de la granulosa. Le système immunitaire semble être activement impliqué dans le processus de la lutéolyse et il est possible que les cellules lutéales interagissent avec certains types de cellules immunitaires (Pate, 1994).

L'embryon de vache exerce un effet anti-lutéolytique à travers la sécrétion de l'interféron-tau (Roberts, 1989, 1993). Ce facteur agit localement à l'intérieur de

l'utérus pour inhiber aussi bien la sécrétion de la  $PGF2\alpha$  (Meyer et al., 1995; Pru et al., 2001) que le développement des récepteurs à l'ocytocine (OTr) sur l'endomètre (Kimura et al., 1992). L'environnement de la P4 maternelle apparaît avoir une influence majeure sur le développement de l'embryon très tôt et sur son habileté à produire l'interféron-tau. Chez la vache, les concentrations endométriales des OTr sont basses ou indétectables du jour 6-8 au jour 15-17 de la phase lutéale (Mann & Lamming, 1994). La sécrétion pulsatile de la  $PGF2\alpha$  lutéolytique commence au jour 17 de la phase lutéale et est associée à une faible concentration endométriale des OTr (Mann & Lamming, 1994). La libération de la  $PGF2\alpha$  requiert seulement une modeste augmentation des OTr utérins. Chez la vache, les OTr apparaissent d'abord sur l'épithélium luminal de l'endomètre utérin et par l'intermédiaire de ces récepteurs, les pulses de l'ocytocine initient une augmentation de la concentration de la  $PGF2\alpha$  (McCracken et al., 1996). Ceci se produit au même moment que l'utérus développe son habileté à libérer la  $PGF2\alpha$  en réponse à l'ocytocine.

## **2.10. L'atrésie folliculaire**

L'atrésie constitue le devenir de la majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères (Driancourt et al., 1991b). Ce mécanisme joue indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation et peut se produire à n'importe quel moment de la folliculogénèse. Plus de 99 % des follicules ovariens présents à la naissance n'atteindront jamais l'ovulation (Markström et al., 2002). En effet, c'est la norme pour un follicule de mourir plutôt que d'ovuler (Billig et al., 1996). La dégénérescence des follicules est contrôlée hormonellement puisque son initiation dépend de stimuli spécifiques reçus via des signaux hormonaux (Tilly,

1996; Kaipia & Hsueh, 1997). Elle est dirigée par un mécanisme de mort cellulaire programmée dans l'ovaire appelé apoptose (Schwartzman & Cidlowski, 1993; Johnson & Bridgham, 2002).

Il existe en fait deux types majeurs de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose. La nécrose est caractérisée par la rupture de la membrane cellulaire et la perte du cytoplasme (Kiess & Gallaher, 1998). Elle cause souvent une réponse inflammatoire et une réaction pathologique (Ameisen, 1996; Hardy, 1999). Par contre, l'apoptose ou mort cellulaire programmée est une forme physiologique de mort cellulaire (Thompson, 1995; Kaipia & Hsueh, 1997) qui survient à chaque stade du développement folliculaire, excepté au stade final de la croissance folliculaire précédant l'ovulation (Gougeon, 1986). À ce stade, il existe une égalité entre le nombre de corps jaunes et le nombre de follicules qui répondent à la relâche préovulatoire de la LH entraînant une diminution de la sensibilité à l'apoptose (Markström et al., 2002). La stéroïdogénèse est fortement perturbée dès le début de l'atrésie puisque les follicules atrétiques perdent la capacité d'aromatiser les androgènes et démontrent une baisse dans la production d'œstrogènes (Oussaid et al., 2000).

Un grand nombre de gènes sont identifiés pouvant être impliqués dans l'activation de l'apoptose dans différents tissus et chez différentes espèces. Certains de ces gènes sont essentiels au programme d'apoptose et la perte de leurs fonctions prévient la mort cellulaire (Billig et al., 1996). Lorsque la décision de mort cellulaire est déclenchée, l'exécution du mécanisme apoptotique requiert l'activation et la propagation coordonnées de plusieurs facteurs (Hengartner, 2000). Ces facteurs

incluent, entre autres, les caspases (Fernandes-Alnemri et al., 1994, 1996; Kamens et al., 1995; Munday et al., 1995; Nicholson et al., 1995; Boldin et al., 1996; Li et al., 1997; Eckhart et al., 2001; Huang et al., 2001), la famille des « *B Cell Leukemia 2* » (Bcl-2; Hockenbery et al., 1990), le facteur « *Inhibitor of Apoptosis Proteins* » (IAP) et la famille de récepteurs du TNF $\alpha$  (Pennica et al., 1984; Wang et al., 1985; Johnson & Bridgham, 2002; Markström et al., 2002).

Les caspases (« *Cysteiny Aspartate-Specific Proteinase* ») sont des protéases à cystéine considérées comme les exécuteurs du processus apoptotique (Hengartner, 2000). La première évidence du rôle primordial des caspases dans l'étape d'exécution d'un signal de mort provient de l'identification puis du clonage chez *C. elegans* du gène pro-apoptotique « *Cell Death Gene* » (*ced-3*; Yuan et al. 1993). *Ced-3* est la protéine la plus en aval dans l'induction de la mort cellulaire et semble jouer un rôle d'exécuteur (Ameissen, 2002). Le premier homologue de *ced-3* identifié chez les mammifères a été « *Interleukin-1 beta Converting Enzyme* » (ICE; Cerretti et al., 1992) plus tard rebaptisé caspase 1 (Couzinet et al., 2002). En réponse aux stimuli induisant la mort cellulaire, les caspases sont activées séquentiellement (Hengartner, 2001) et leurs actions sont reliées aux stades initial et final de l'apoptose (Johnson & Bridgham, 2002). Chaque caspase est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif ou zymogène qui est activé seulement après que la cellule ait reçu le signal de mort (Spanos et al., 2002; Troy & Salvesen, 2002).

Les caspases possèdent en position amino-terminale un pro-domaine long ou court donnant des caspases initiatrices ou exécutrices de l'apoptose et leur activation peut se faire par deux voies moléculaires principales (Couzinet et al., 2002). La

première est déclenchée par des protéines relarguées provenant des mitochondries endommagées et la seconde est déclenchée sur la membrane plasmique par l'activation des récepteurs membranaires. Cependant, le clivage et l'activité des caspases peuvent être empêchés par les IAP qui inhibent la mort cellulaire en se liant directement aux caspases (Fesik & Shi, 2001). Malgré l'élucidation de la cascade des caspases permettant l'amplification et l'intégration des signaux pro-apoptotiques, ces informations ne sont pas suffisantes pour expliquer comment la caspase la plus en amont devient activée (Hengartner, 2000).

Le relargage de protéines pro-apoptotiques issues de la mitochondrie vers le cytosol est une étape clé de la voie mitochondriale d'activation de l'apoptose. Ce relargage est sous le contrôle des membres de la famille de Bcl-2 (Solary et al., 2002). La fonction essentielle des membres de cette famille serait de contrôler la libération de facteurs pro-apoptotiques à partir de la mitochondrie (Antonsson & Martinou, 2000; Susin et al., 2000). La protéase Bcl-2 est associée aux mitochondries et inhibe la libération du cytochrome c qui est une étape critique du processus d'apoptose (Kluck et al., 1997; Bossy-Wetzel & Green, 1999). En plus du cytochrome c, l'adénylate kinase, différentes caspases ainsi que le « *Apoptotic Inducing Factor* » (AIF; Zou et al., 1997; Hahn et al., 1999), tous présents dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, sont libérés durant l'apoptose. La translocation de l'AIF se fait de la mitochondrie vers le noyau où il provoque l'apoptose nucléaire (Susin et al., 1996). Le cytochrome c, en s'associant avec le « *Apoptotic Protease Activating Factor 1* » (Apaf1; Zou et al., 1997) et en présence d'ATP, permet le recrutement de la pro-caspase 9 formant un complexe nommé

apoptosome qui est à l'origine de l'activation de la caspase 9 (Couzinet et al., 2002). Cette dernière activera à son tour des caspases effectrices dont la caspase 3 (Schuler et al., 2000; Markström et al., 2002). La famille de Bcl-2 a une importance cruciale dans le contrôle des voies de signalisation de la mort cellulaire et comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques qu'anti-apoptotiques. À la suite d'un signal apoptotique, les protéines pro-apoptotiques dont le « Bcl-2-Associated X protein » (Bax; Oltvai et al., 1993; Tilly, 1996; Solary et al., 2002) s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation (Jacotot et al., 1999; Crompton, 2000).

Un des plus puissants modulateurs de l'apoptose dans l'ovaire bovin et de la ratte est le  $\text{TNF}\alpha$  (Kaipia et al., 1996). Il a été montré que  $\text{TNF}\alpha$  induit l'apoptose en activant des exécuteurs tels que ICE (Zhang et al., 2001). Plusieurs des effets biologiques du  $\text{TNF}\alpha$  se produisent à travers le récepteur  $\text{TNF}\alpha$  de type 1, le « *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 1A* » (TNFRSF1; Stauber et al., 1988; Gray et al., 1990). Ce récepteur contient dans sa portion cytoplasmique un domaine de mort impliqué dans la transduction du signal de l'apoptose (Grell et al., 1999). Dans cette voie, Porter et al. (2001) ont démontré une augmentation de la concentration du récepteur de mort cellulaire Fas et de son ligand Fas-L dans les follicules atrophiques. Le récepteur Fas ainsi que le récepteur TNF sont des membres de la superfamille des TNFR et sont appelés récepteurs de mort cellulaire. La liaison des ligands à ces récepteurs entraîne l'assemblage des récepteurs et la formation d'un complexe nommé « *Death-Inducing Signaling Complex* » (DISC). Ce dernier recrute de multiples copies de la pro-caspase 8 via la protéine adaptatrice cytoplasmique

«*Fas-Associated Death Domain* » (FADD; Chinnaiyan et al., 1995; Kabra et al., 2001; Markström et al., 2002). Le rapprochement des pro-caspases 8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la libération de la forme active, la caspase 8, dans le cytosol. Cette dernière activera des caspases effectrices comme les caspases 3, 6 et 7 (Scaffidi et al., 1998; Couzinet et al., 2002).

Un ensemble d'hormones et de facteurs localement produits contrôlent la décision de mourrir par la voie de leurs récepteurs. L'identification de la caspase 8 dans le DISC lie directement le récepteur Fas à la cascade des caspases (Couzinet et al., 2002). Un membre de la famille de Bcl-2 à domaine BH3 appelé « *BH3 Interacting Domain Death Agonist* » (Bid; Wang et al., 1996; Luo et al., 1998), constitue un des liens entre la voie du récepteur et la voie mitochondriale. Bid, en se liant à Bax, induit son oligomérisation et son intégration dans la membrane externe mitochondriale causant la libération du cytochrome c (Couzinet et al., 2002). Pour chacune de ces deux voies moléculaires conduisant à la mort cellulaire, à savoir la voie mitochondriale et la voie des récepteurs de la mort, les mécanismes d'intégration des signaux s'établissent au niveau d'un complexe multiprotéique, respectivement l'apoptosome et le DISC. C'est en agissant au niveau de la formation et/ou de l'activité de ces derniers que la plupart des modulateurs de la mort cellulaire exercent leurs actions (Couzinet et al., 2002).

Les cellules folliculaires en dégénérescence sont perdues dans la cavité antrale ou phagocytées par les cellules de la granulosa ou les macrophages suivi d'un amincissement progressif de la granulosa. Après la phase d'induction de la mort cellulaire et avant même le démantèlement complet de la cellule, se produit la phase

d'élimination de la cellule mourante par une phagocytose spécialisée nommée «*engulfment* » (Alibert & Chimini, 2002). À un stade plus avancé, la granulosa a presque entièrement disparu, puis les cellules de la thèque dégèrent et sont phagocytées. Une invasion des fibroblastes provenant de la thèque externe et des mononucléaires remplacent les composantes folliculaires puis le follicule s'affaisse et se confond peu à peu au stroma ovarien. Les cellules apoptotiques qui n'ont pas été phagocytées subissent une nécrose secondaire qui est caractérisée par une augmentation de la perméabilité membranaire et la distension des structures de membrane cytosolique (Hardy, 1999).

### **2.11. Identification des gènes impliqués dans le développement folliculaire**

De nombreux mécanismes cellulaires normaux et pathologiques mettent en jeu une expression différentielle de plusieurs gènes (Wang & Feuerstein, 2000). Certains gènes sont exprimés dans des tissus donnés, à des moments spécifiques et selon des intensités particulières. L'identification et la caractérisation de ces gènes ainsi que l'étude de leurs expressions constituent une avancée fondamentale dans la compréhension des mécanismes biologiques. Avant les années 90, les techniques de séquençage ne permettaient pas de générer des résultats scientifiques de grande envergure malgré les efforts et les fonds investis (Martin-Gallardo et al., 1992). L'approche des « *Expressed Sequence Tags* » (EST), de courts fragments d'ADNc, s'est révélée une méthode efficace pour identifier rapidement de nouveaux gènes. De très nombreuses séquences partielles d'ADNc continuent d'ailleurs à être obtenues dans le cadre de projets EST en ciblant des tissus spécialisés dont les gènes, spécifiquement exprimés, n'ont pas été échantillonnés. L'obtention, par la suite,

d'ADNc complets (« *full length* ») et leur séquençage deviennent les objectifs de nombreux laboratoires. Le but consiste donc à obtenir des banques ou génothèques contenant une forte proportion d'ADNc complets, puis à identifier les clones correspondant à ce critère grâce à un séquençage partiel et enfin à déchiffrer intégralement les séquences qui sont à la fois complètes et nouvelles (Jordan, 2001; Strausberg et al., 2002; Imanishi et al., 2004; Ota et al., 2004). Cette approche nous a permis d'établir une génothèque d'ADNc issus d'ARNm de cellules de la granulosa de follicules dominants à J5 du cycle œstral dans les phages *Lambda* (Brûlé et al., 2000).

Le criblage aléatoire d'une génothèque d'ADNc entraîne l'isolement de nombreux gènes. Toutefois, plus le nombre de clones d'ADNc augmente, plus on observe une redondance des clones analysés (Smith et al., 2001). C'est la raison pour laquelle des méthodes d'analyse différentielle ont été développées afin de sélectionner des clones d'intérêt représentatifs d'un type cellulaire donné ou d'un même type cellulaire mais correspondant à un statut physiologique différent. De nombreuses techniques d'hybridation soustractive ont ainsi été développées et utilisées pour isoler des gènes significatifs dans plusieurs systèmes (Sargent & Dawid, 1983; Hedrick et al., 1984; Wang & Brown, 1991; Hubank & Schatz, 1994). Cependant, plusieurs de ces techniques requièrent soit des procédures compliquées, soit de large quantités de matériel de départ, réduisant ainsi leur utilité générale (Diatchenko et al., 1999). Ces techniques peuvent être améliorées davantage si les procédures sont simplifiées et/ou utilisées avec des quantités limitées de matériel de départ. Pour atteindre cet objectif, la technique d'hybridation soustractive suppressive

(*Suppression Subtractive Hybridization*, SSH) a été développée (Diatchenko et al., 1996, 1999). Cette dernière permet l'amplification sélective, par PCR, de fragments d'ADNc correspondant aux ARNm dont l'expression est modifiée tout en empêchant simultanément l'amplification d'autres ADNc constitutivement exprimés (Wang et al., 1998). Cependant, la procédure de la SSH produit un grand nombre de clones et une approche de criblage différentiel doit lui être couplée afin d'identifier et de vérifier les ADNc différentiellement exprimés. La SSH est une procédure sensible autorisant des comparaisons de groupes d'ARNm entier entre différents types de cellules. De plus, les ADNc issus de la SSH peuvent être caractérisés entièrement suite à des étapes de clonage et de criblage de génothèque réduite (Lévesque et al., 2003).

D'autres stratégies d'analyse différentielle ne nécessitant pas de clonage préalable des ARNm ont été utilisées pour l'étude de l'expression génique et pour la découverte de nouveaux gènes dont la « *Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* » (DDRT-PCR). Elle permet l'identification de gènes qui sont sur-exprimés ou sous-exprimés en comparant les profils d'expression de plusieurs ARNm de différentes sources. Malgré ses avantages, certains inconvénients limitent l'utilisation de la DDRT-PCR (Tavares et al., 2001). Les clones d'ADNc obtenus sont représentés en grande partie aux extrémités 3' des ARNm alors que les extrémités 5' ne sont pas détectées (von Stein et al., 1997). De plus, le pourcentage de faux-positifs peut être élevé (Sun et al., 1994) et l'obtention de séquences aux extrémités 3', région peu conservée entre les espèces comparativement aux séquences codantes, nécessitent le criblage de génothèque d'ADNc. Cette étape permet le clonage de l'ADNc complet et l'identification précise du gène différentiellement

exprimé. La DDRT-PCR reste néanmoins une approche ayant permis la caractérisation de gènes spécifiques notamment lors de la croissance folliculaire chez la vache (Bédard et al., 2003). Toutes ces techniques sont valablement utilisées pour la découverte de nouveaux gènes dans plusieurs systèmes et chez différentes espèces malgré leurs limites respectives.

### **3. Hypothèse, modèle d'étude et objectifs**

Du fait de la variété des facteurs impliqués et de leur très probable interaction lors de la croissance et de la dominance folliculaires, des questions majeures concernant les processus de folliculogénèse et d'ovulation demeurent encore non résolues. Il est donc nécessaire d'améliorer notre compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués lors de ces divers processus afin de mieux saisir les phénomènes associés au succès de la reproduction chez l'espèce humaine et chez les animaux domestiques ayant un impact économique. La vache a été privilégiée comme modèle expérimental du fait que c'est une espèce monoovulatoire ayant un volet économique important et chez laquelle les événements physiologiques ovariens sont représentatifs de ce qui se produit chez la femme. Son cycle œstral peut être synchronisé et la succession régulière des vagues folliculaires se produit à 7-8 jours d'intervalle au cours du cycle œstral. De plus, il est possible de suivre, à l'intérieur des vagues, la croissance et la régression des follicules individuels de diamètre égal ou supérieur à 4 mm. Ces divers avantages permettent l'échantillonnage du matériel biologique en quantité suffisante et la collecte des follicules souhaités aux moments choisis. L'espèce bovine constitue donc un modèle

animal idéal pour étudier les mécanismes locaux et endocriniens impliqués dans les phénomènes de la croissance folliculaire terminale et de l'ovulation.

L'hypothèse du projet sous-tend que la croissance du follicule dominant suivie de son développement au cours du stade ovulatoire résulte de la variation du profil d'expression spatio-temporel de gènes spécifiques. Dans le cadre d'un premier projet (**chapitre 2**), l'objectif fut d'établir le profil d'expression génique dans les cellules de la granulosa provenant de follicules dominants (DF) à J5 du cycle œstral comparé aux follicules ovulatoires (OF) obtenus à 23 heures suivant l'injection d'hCG. La comparaison du profil d'expression génique a été réalisée par l'approche de l'hybridation soustractive suppressive (SSH). Cette technique a permis d'enrichir les ADNc différemment exprimés dans les follicules dominants. Pour ce faire, les ADNc de follicules ovulatoires ont été soustraits des follicules dominants afin d'établir une génothèque soustraite (DF-OF). Ce projet visait l'établissement d'un index d'ADNc différemment exprimés dans les cellules de la granulosa de follicule dominant. Les résultats obtenus à partir du criblage de la génothèque soustraite d'ADNc DF-OF ont permis de développer le deuxième projet (**chapitre 3**) dont l'objectif visé fut de caractériser l'ADNc correspondant au gène « *Tribbles homolog 2* » (TRB2). L'expression de son ARNm a été étudiée au cours du développement folliculaire. Des anticorps ont été générés contre un fragment de la protéine TRB2 bovine afin d'analyser l'expression de la protéine TRB2. De plus, la caractérisation systématique d'ADNc à partir d'une génothèque d'ADNc de follicules dominants à J5 du cycle œstral a constitué le troisième projet du travail (**chapitre 4**). L'objectif fut de caractériser entièrement deux ADNc, initialement inconnus et

nommés Gran-5 (« *Lysosomal-associated protein transmembrane 4 beta* », LAPT4B) et Gran-17 (« *Degradation in endoplasmic reticulum 1* », Derlin-1), issus des cellules de la granulosa et d'étudier les niveaux d'expression de leurs ARNm. Des anticorps ont été générés contre un fragment de LAPT4B afin d'analyser l'expression de la protéine.

## CHAPITRE 2

**Identification of down-regulated mRNAs in bovine granulosa cells of dominant follicle following stimulation with human chorionic gonadotropin (hCG)**

Kalidou Ndiaye, Tania Fayad, David W. Silversides, Jean Sirois and Jacques G. Lussier<sup>1</sup>.

Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Tel: 450-773-8521 (ext. 8363); Fax: 450-778-8103; E-mail:



Running title: Gene expression in bovine granulosa cells

Key words: ovary, follicle, granulosa, gene expression, dominance, ovulation.

## Abstract

Molecular determinants and mechanisms involved in ovarian follicular growth, ovulation and luteinization are not well understood. The objective was to identify genes expressed in bovine granulosa cells (GC) of dominant follicles (DF) and down-regulated after hCG-induced ovulation using suppression subtractive hybridization (SSH) method. GC were collected from DF at day 5 of the estrous cycle and from ovulatory follicles (OF) obtained 23 h following injection of hCG. A subtracted cDNA library (DF-OF) was generated, and 940 cDNA clones were arrayed to establish macro-arrays that were then screened using unsubtracted (DF, OF) and subtracted (DF-OF, OF-DF) cDNAs as complex  $^{32}\text{P}$ -probes. The differentially hybridizing cDNAs identified were classified as follow: 23 non-redundant cDNAs matched with sequences of known biological function; 8 cDNAs matched with complete or partial sequence of undefined biological function; and 3 cDNAs found no match in GenBank. ApoER2, CPD, CYP11A, CYP19, FSHr, and SERPINE2 were identified and known to be down-regulated during the periovulatory period in the bovine species. For a subset of genes such as ARFGAP3, CX43, CYP19, FSHr, FST, INHBA, LHr, LHr lacking exon 10, PRG1, RPA2, and TRB2, gene expression profiles were compared by virtual Northern blot or reverse transcriptase-polymerase chain reaction from follicles obtained at different developmental stages. Results confirmed a down-regulation of their mRNA in GC of OF compared with that of DF. We conclude that we have identified novel genes that are down-regulated by hCG in bovine GC of DF during the periovulatory period which may contribute by their absence, in a permissive fashion, to follicular growth, ovulation and/or luteinization.

## Introduction

In cattle, formation of follicular antrum begins at 0.2 mm in diameter, and follicles from 0.2 to 2 mm in size constitute a large pool of mostly healthy growing follicles (1,2). As these follicles continue developing, most degenerate through atresia (3). At around 3 to 4 mm in diameter, most follicles are lost by atresia if circulating FSH concentration is not optimal to promote and sustain follicular growth beyond that stage (2,4). Two to three times during the bovine estrous cycle, an estimated number of 7 to 11 follicles at the 3-4 mm stage are recruited into a wave pattern to pursue their development. This cyclic recruitment process is preceded by an increase in circulating FSH concentrations (5,6). A selection phase follows, where a single follicle continues its development and becomes the dominant follicle (DF), whereas subordinate follicles degenerate by atresia. Circulating FSH concentrations remain low during the functional dominance phase. The DF encountered at different times of the estrous cycle is capable of ovulation as demonstrated by injection of human chorionic gonadotropin (hCG; 7). The preovulatory luteinizing hormone (LH) surge induces changes in different compartments of the DF that triggers ovulation, and promotes final maturation of the oocyte. The mechanisms ensuring the transition from a DF into an ovulatory follicle (OF) are not fully understood (8,9).

In the past years, emphasis of research focused on genes that were induced in the OF by the LH/hCG surge (8-10). Identification of genes that are down-regulated in the DF may also contribute to understand their involvement in follicular growth and oocyte quality as well as ovulation and luteinization mechanisms. Thus, the overall objective of this research was the identification of genes that may contribute

to the growth of the DF or preovulatory follicle and its differentiation into an OF. The working hypothesis is that development of the OF results from transcriptional down-regulation of genes that are cell-specific and temporally regulated. To study this biological process in mono-ovulatory species, cows were used since they present well-characterized phases of follicular development that can be monitored by daily transrectal ultrasonography, and ovaries may be collected at specific time points for molecular analysis. Gene expression was studied in granulosa cells (GC) since they represent an important compartment of the ovarian follicle involved in hormone synthesis and maturation of the oocyte (8). The specific objective of this study was to identify genes that are down-regulated in GC of growing DF compared to OF following injection of an ovulatory dose of hCG. The transition from a DF into an OF requires modification of gene expression, and identification of the molecular determinants of this process is incomplete. Gene expression analysis was achieved by use of suppression subtractive hybridization (SSH; 11) that permitted enrichment of differentially expressed genes followed by the establishment and analysis of a granulosa cell subtracted cDNA library from dominant follicles. Genes that were found to be differentially expressed were then further validated by virtual Northern blot or reverse transcriptase-polymerase chain reaction from independent follicles obtained at different developmental stages.

## Materials and Methods

### Experimental animal model and sample preparations

Normal cycling crossbred heifers were synchronized with one injection of PGF<sub>2α</sub> (25 mg, im; Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI) given in presence of a corpus luteum (CL). Behavioral estrus was monitored at 12 h intervals, from 48 h to 96 h following PGF<sub>2α</sub> injection. From the time of PGF<sub>2α</sub> injection until ovariectomy, ovarian follicular development was monitored by daily transrectal ultrasonography performed with a real-time linear scanning ultrasound diagnostic system (LS-300; Tokyo Keiki Co, Ltd, Tokyo, Japan) equipped with a 7.5-MHz transducer probe (2). At each examination, the diameter of the CL and individual follicles  $\geq 4$  mm were measured at their largest cross-sectional area using internal calipers. Following estrus synchronization by PGF<sub>2α</sub>, heifers were randomly assigned to one of two treatment groups: 1) the dominant follicle group (DF; n = 4), or 2) the ovulatory hCG-induced follicle group (OF; n = 4). In the DF group, the ovary bearing the DF on the morning of day 5 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus) was obtained by ovariectomy (via colpotomy). The DF was defined as  $> 8$  mm and growing while subordinate follicles were either static or regressing (12). The OF were obtained following an injection of 25 mg of PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse) on day 7 to induce luteolysis, thereby maintaining the development of the DF of the first follicular wave into a preovulatory follicle (7). An ovulatory dose of hCG (3000 IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC) was injected 36 h after the induction of luteolysis, and the ovary bearing the hCG-induced ovulatory follicle was collected by ovariectomy between 22 to 23 h after hCG injection. Immediately following ovariectomy, ovaries were rinsed with ice-cold

physiological saline and transferred into ice-cold HEPES-buffered Dulbecco modified eagle medium (DMEM; Life Technologies, Burlington, ON). Follicular fluid and GC with oocytes were collected separately from individual DF or OF as described previously (12). Additionally, GC/oocytes and follicular fluid were collected from 2-4 mm follicles that were obtained from slaughterhouse ovaries representing a total of three pools of 20 small follicles (SF). These experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. Concentrations of progesterone ( $P_4$ ), estradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ ) and their ratio ( $P_4/E_2$ ) were analyzed by RIA of follicular fluid as previously described (12). The  $E_2/P_4$  ratios were calculated for each sample: 1) 0.008, 0.06 and 0.01 for the three SF pools; 2) 17.3, 19.7, 14.3 and 63.4 for individual DF at day 5 ( $n = 4$ ); and 3) 0.44, 0.87, 0.64 and 0.27 ( $n = 4$ ) for individual OF. CL at day 5 of the estrous cycle were obtained by ovariectomy from cows following ultrasound monitoring of follicular development and estrus synchronization as described above. The CL were dissected from the ovarian stroma, frozen in liquid nitrogen, and then stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  until RNA extraction. Total RNA was isolated from GC/oocytes or CL as previously described (12). The concentration of total RNA was quantified by measurement of optical density at 260 nm, and quality was evaluated by visualizing the 28S and 18S ribosomal bands following electrophoretic separation on formaldehyde denaturing 1% agarose gel with ethidium bromide (13).

### **Suppression subtractive hybridization**

Suppression subtractive hybridization (SSH; 11) was used to compare gene expression in GC collected from DF versus OF groups. Identical amounts of total

RNA (2 µg) from four DF or four OF were pooled within treatment groups to decrease inter-animal variation. To generate sufficient amounts of double-stranded cDNA for an SSH experiment, both DF and OF cDNAs were amplified using the SMART PCR cDNA synthesis kit (User manual: PT3041-1; BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON; 14,15). One microgram of total RNA from each pooled group was reverse-transcribed with an oligo-dT30 primer (CDS: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT<sub>(30)</sub>(A/C/G/T)(A/G/C)-3') and PowerScript (BD Biosciences Clontech) to generate the first strand cDNA. Second cDNA strands were produced with the SMART II 5'-anchored oligo (AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG), and PCR-amplified for 15 cycles using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech).

The DF cDNAs were subtracted against OF cDNAs (forward reaction: DF-OF) using PCR-Select cDNA subtraction technology (User manual: PT1117-1; BD Biosciences Clontech). In a parallel experiment, the OF cDNAs were subtracted against the DF cDNAs (reverse reaction: OF-DF). Briefly, PCR-generated DF and OF cDNAs were digested with *RsaI* to generate blunt-ended cDNA fragments (from 0.2 to 2 kb) that are suitable for adaptor ligation and optimal for subtractive hybridization (11). The DF cDNAs were subdivided into two pools and ligated to different adaptors (adaptor 1: CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT; or adaptor 2R: CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT). For the first hybridization, the pools of adaptor ligated-DF (tester) and OF (driver) cDNAs were incubated for 8 h at 68 °C. This first hybridization normalizes and

enriches for differentially expressed genes. For the second hybridization, excess competitor OF cDNAs were added directly to the pooled mix of the previous two hybridizations and incubated at 68 °C for 18 h, generating DF cDNAs harboring different 5' or 3' adaptors (1 and 2R). Differentially-expressed cDNAs with different adaptor ends in the DF group were amplified by 27 primary PCR cycles, and subsequently enriched by 12 secondary nested PCR cycles (PCR-nested 1: TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT; and PCR-nested 2R: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT).

The efficiency of subtraction was analyzed by comparing the abundance of cDNAs before and after subtraction by PCR using bovine gene specific primers for a gene known to be down-regulated by hCG such as cytochrome P450 aromatase (P450<sub>arom</sub> or CYP19; sense: GTCCGAAGTTGTGCCTATTGCCAGC ; anti-sense: CCTCCAGCCTGTCCAGATGCTTGG; 16), and a gene known to be induced by hCG such as prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2; sense: GCATTCTTTGCCCAGCACTTCACCC; anti-sense: CTATCAGGATTAGCCTGCTTGTCTGG; 17). PCR amplification was performed using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech), and 5 µl aliquots were removed following determined numbers of PCR cycles. The amplified products were resolved on a 2% agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, 0.5 µg/ml ethidium bromide). The difference in the number of cycles needed to generate an equal amount of the corresponding PCR product in subtracted and unsubtracted samples served to indicate the subtraction efficiency.

### **Cloning of subtracted cDNAs**

The subtracted cDNAs were cloned into the pT-Adv plasmid (BD Biosciences Clontech) to construct the DF-OF subtracted library as described previously (18). Ligated DNA was used to transform competent TOP10F' *E. coli*, which were plated onto S-Gal/LB agar (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) containing kanamycine (40 µg/ml). Individual colonies (n = 940) were transferred into 96-well plates, grown in LB freezing media (8.8% glycerol, 55 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 26 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)) for 14 h at 37 °C and frozen at -70°C.

### **Differential hybridization screening**

The subtracted DF-OF cDNA library was used to established macro-arrays for differential screening. The insert of each cDNA clone was amplified in 96-well plates by PCR (28 cycles) using the PCR-nested primers 1 and 2R, and AmpliTaq DNA polymerase (Roche Molecular Systems Inc, Laval, QC). To establish the cDNA macro-arrays, an aliquot of each amplification product was denatured in 0.3 M NaOH with 5% bromophenol blue, and 10 µl were vacuum transferred with a 96-well dot-blot apparatus onto nylon membrane (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) and cross-linked with UV (150 mj; Gs Gene Linker, Bio-rad, Mississauga, ON). Control cDNAs (PGHS2, CYP19) were PCR-amplified from their full-length cloned cDNA plasmids using the oligos described above. The cDNA fragments were purified on a 2% agarose 1X TAE gel, and extracted (QIAquick, Gel Extraction Kit, Qiagen Inc) before being transferred onto macro-arrays. Four identical cDNA macro-array membranes were generated from each 96-well plate.

The DF or OF unsubtracted mixtures, or the DF-OF or OF-DF subtracted mixtures were used as complex hybridization probes for differential screening of macro-arrays of the DF-OF cDNA library. Probes were obtained by performing the secondary nested-PCR, and were then purified (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen Inc). To prevent non-specific interaction of the probes to cDNAs on macro-arrays during hybridization, the adaptors were removed by three successive digestions with *AfaI*, *SmaI* and *EagI* (11), the cDNA mixture was again purified (QIAquick, PCR Purification Kit, Qiagen Inc), and 100 ng were labeled with  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP by random priming (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech). The probes were purified (QIAquick Nucleotide Removal kit, Qiagen Inc) and quantified using a beta-counter.

The cDNA macro-array membranes were incubated for 4 h at 71°C in 20 ml of prehybridization solution (600 mM NaCl, 120 mM Tris pH 7.4, 4 mM EDTA, 0.1%  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 0.2% SDS, and 500  $\mu\text{g/ml}$  heparin) to which heat denatured (5 min, 100 °C) oligos were added to prevent non-specific binding [1 mM each: PCR-Nested 1; PCR-Nested 2R; PCR-Nested 1-INV (ACCTGCCCCGGGCGGCCGCTCGA); PCR-Nested 2R-INV (ACCTCGGCCGCGACCACGCT); 2 mM poly dAdT (Amersham-Pharmacia Biotech)]. An equal amounts (cpm) of each heat-denatured cDNA probe (DF-OF, OF-DF, DF or OF) were added to separate 15 ml aliquots of hybridization solution and used to hybridize a designated duplicate of the DF-OF macro-array membrane. The hybridization solution was identical to the prehybridization solution but contained 15  $\mu\text{g}$  salmon sperm DNA and 10% dextran sulfate. The membranes were hybridized for 16 h at 71°C, then were washed for 15

min in 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM NaCitrate) and 0.1% SDS, followed by two 1 h washes in 0.1X SSC and 0.1% SDS at 71°C. Membranes were exposed to a phosphor screen for 4 to 16 h and the images were digitized (Storm 840; Amersham-Pharmacia Biotech). The differentially hybridizing cDNA clones were further characterized by DNA sequencing and gene expression analysis.

### **DNA sequencing and sequence analysis**

The cDNA clones identified as differentially expressed by the DF-OF subtracted probe were amplified by PCR for 15 cycles with the corresponding PCR-nested 1 and PCR-nested 2 oligos from the PCR product generated initially for the macro-arrays. The PCR product was purified (Qiagen Inc, Mississauga, ON) and verified by agarose gel analysis for the presence of a single cDNA band before proceeding with sequencing. Sequencing reactions were performed on cDNA clones via the dideoxy sequencing method (Big Dye Terminator 3.0; ABI Prism, Applied BioSystem, PE, Branchburg, NJ) using the oligos PCR-Nested 1 (1 mM) or P2R-INV (1 mM). Sequencing reactions were then analyzed on an ABI Prism 310 sequencer (Applied Biosystem). Nucleic acid sequences were analyzed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) against GenBank data banks (NR and EST). A cDNA sequence was considered homologous to a GenBank sequence when at least a 100 bp matched with an E probability value of less than  $e^{-10}$ . The differentially expressed cDNAs were classified into three groups: 1) genes with known sequence and function; 2) genes with known sequence but unknown function; and 3) sequences with no significant match.

### Gene expression analysis

The cDNA clones that were identified as differentially expressed in the SSH experiment were used to verify and compare their differential expression pattern in GC of different stage follicles and corpus luteum using virtual Northern analysis or semi-quantitative RT-PCR. To perform virtual Northern blots, SMART PCR cDNA synthesis technology (BD Biosciences Clontech) was used to generate cDNAs from 1  $\mu$ g of total RNA isolated from GC/oocytes or CL as described above. The SMART cDNA synthesis was done in a total volume of 10  $\mu$ l with the addition of 42 ng of T4 gene 32 protein (Roche Molecular Biochemicals, Laval, PQ) and PCR-amplified for 15 cycles as described previously (18). The resulting cDNA pool was diluted to 50  $\mu$ l in TE buffer, and 1  $\mu$ l of the diluted pool was used in a secondary 100  $\mu$ l PCR reaction for 18 cycles using Advantage 2 DNA polymerase and the PCR primer (AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT). The cDNA products (10  $\mu$ l) of the secondary PCR for each follicle or CL were separated on a 0.8% TBE-agarose gel (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide) for 4-5 h at 80-90 volts (13). Molecular weight standards (1 kb ladder,  $\phi$ X174-RF/Hae III and  $\lambda$ /Hind III; Amersham Pharmacia Biotech) were included to estimate size. The gel was washed in TBE buffer for 30 min, and cDNA samples were transferred onto nylon membrane (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham-Pharmacia Biotech) by alkaline capillary transfer (13), and then cross-linked by UV treatment (150 mj; GS Gene Linker, BioRAD laboratories).

Virtual Northern analysis was performed with differentially expressed cDNA fragments from the DF-OF group that had been classified as genes with known

sequences and functions. Gene-specific probes were generated by PCR (20 cycles) using the primers PCR-Nested 1 and PCR-Nested 2R. The PCR products were separated on a 2% agarose gel in 1X TAE buffer. The cDNA bands were purified (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen Inc), digested with *AfaI* and *EagI* then re-purified (QIAquick, PCR Purification Kit, Qiagen Inc). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPD) probe was used as a constitutively expressed gene. Bovine GAPD probe was PCR-amplified from its full-length cloned cDNA plasmid using the following oligos (sense: TGTTCCAGTATGATTCCACCCACG; anti-sense: CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAACC; 19). Purified cDNA probes were labeled with  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP as described above. Virtual Northern membranes were prehybridized, hybridized and washed as described for the differential hybridization of macro-arrays, except that oligos were omitted during the prehybridization and hybridization steps. Membranes were exposed to phosphor screen and the images were digitized (Storm 840; Amersham Pharmacia Biotech).

A comparative RT-PCR was performed for genes that showed either a weak or no signal by virtual Northern analysis, or for which gene-specific primers were available. From diluted SMART cDNAs as described above, 1  $\mu\text{l}$  was used in a 25  $\mu\text{l}$  PCR reaction using the Advantage 2 DNA polymerase. The number of PCR cycles were limited and optimized for each gene to be analyzed. Gene specific PCR primers were for follistatin (sense: CTCTGCCAGTTCATGGAGGACC; anti-sense: GGCCAATCCAATAGATCTGCCC; 20), follicle-stimulating hormone receptor (FSHr; sense: CGACTCTGTCACTGCTCTAACGG; anti-sense: CGTCAATTCCTTTGGCATAGGTGG; 21) and luteinizing hormone receptor (LHr ;

sense: CGACTATCACTCACCTATCTCCC; anti-sense: CAGGACTCTAAGGAAGTTGTAGCC; 19; Genbank accession number U20504), and CYP19 and GAPD as described above. Twenty  $\mu$ l of the PCR reactions were separated on a 2% TAE-agarose gel with ethidium bromide, PCR products were visualized by UV and the images digitized. The digitized signals for each gene obtained either by virtual Northern or semi-quantitative RT-PCR were analyzed by densitometry using ImageQuant software (Amersham Pharmacia Biotech).

### **Statistical analysis**

Gene-specific signals were normalized with corresponding GAPD signals for each sample. Homogeneity of variance between follicular group and CL was verified by O'Brien and Brown-Forsythe tests (22). Corrected values of gene specific mRNA levels were compared between follicular or CL groups by one-way ANOVA and Tukey-Kramer multiple comparison tests. Data were presented as least-square means  $\pm$  SEM.

## Results

### Identification of differentially expressed genes using SSH

A subtracted cDNA library enriched in transcripts expressed in DF that are down-regulated by hCG was constructed following isolation of RNA from GC of DF that were first reverse-transcribed into cDNAs then subtracted by cDNAs from OF (DF-OF). The reverse subtraction reaction was also performed as a control, and consisted of OF cDNAs that were subtracted by DF cDNAs (OF-DF). The subtraction efficiency was evaluated by PCR analysis, which compared abundance of two control cDNAs preceding and following subtraction. To monitor the enrichment of differentially expressed genes in the DF-OF subtracted sample, CYP19 cDNA was used as a positive control in the DF. The CYP19 PCR product was observed after 18 PCR cycles in the DF unsubtracted sample but was undetectable in the OF sample (Figure 1). In the DF-OF subtracted sample, the PCR-amplified CYP19 fragment was detected following 13 PCR cycles, which indicates that CYP19 cDNA was enriched after subtraction. The PGHS2 mRNA was used as a positive control to monitor the enrichment of an hCG-induced gene in the OF-DF subtracted sample. In the OF sample, the PGHS2 PCR product was observed after 18 PCR cycles but was undetectable in the DF sample (Figure 1). In the OF-DF subtracted sample, the PCR-amplified PGHS2 fragment was detected after 13 PCR cycles indicating enrichment of differentially expressed genes in the subtracted OF-DF sample when compared to unsubtracted OF sample.

Once the subtraction efficiency was verified, a subtracted cDNA library was constructed by ligating the DF-OF SSH cDNA products into a plasmid vector from

which 940 bacterial colonies were randomly selected. A differential hybridization screening analysis was performed to identify positive clones before proceeding to their characterization by sequencing. The subtracted (DF-OF, OF-DF) and unsubtracted (DF, OF) cDNA preparations were used as complex hybridization probes for the differential screening of the 940 cDNA clones spotted on four identical sets of macro-arrays. On each of the membranes, CYP19 and PGHS2 cDNAs were spotted as controls. Representative differential screening results are illustrated in Figure 2. The cDNA clones were classified as differentially expressed if they mainly hybridized with the DF-OF subtracted and DF unsubtracted probes, but not with the reverse subtracted probe (OF-DF) and only faintly or not at all with the OF unsubtracted probe, as determined by comparing signal intensities between the four identical macro-arrays. The differential hybridization screening procedure yielded 594 clones (63.2 %) with a detectable hybridization signal. The differential screening identified 222 cDNA clones (23.6%) as true positives. These cDNA clones were amplified by PCR and their PCR-products visualized on agarose gel to only retain clones that presented a single PCR band for further characterization by sequencing (data not shown). Thus, 204 cDNA clones were sequenced and their sequences compared against GenBank databases. The cDNAs were classified as follow: 131 cDNAs matched with sequences of known biological function for a total of 23 non-redundant cDNAs; 32 cDNAs matched with complete or partial sequence of undefined biological function for a total of 8 different cDNAs; and 24 cDNAs found no match in GenBank for a total of 3 non-redundant cDNAs (Table 1). Sixteen cDNA clones were rejected because the quality of the nucleotide sequences generated were not adequate. Apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2; 23), carboxypeptidase D (CPD;

23), CYP19 (24), cytochrome P450 side-chain cleavage (CYP11A; 25), inhibin/activin  $\beta$ -A subunit (INHBA; 26), and serine protease inhibitor E2 (SERPINE2; 12,23), genes known to be down-regulated in bovine GC following the preovulatory LH/hCG surge were identified in the present study, and thus further validated the *in vivo* experimental model and the subtraction procedure used herein. Other genes, such as connexin-43 (CX43; 27), the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR; 21) and follistatin (FST; 20) known to be expressed in GC but to our knowledge their levels of expression were not previously shown to be down-regulated in bovine GC by the preovulatory LH/hCG surge. Another group of 14 cDNAs of known biological function and 11 other cDNAs and ESTs, never shown to be expressed in GC of any species were identified.

#### **Analysis of mRNA expression**

Genes identified by macro-array analysis to be down-regulated by hCG, were further validated by virtual Northern analysis using mRNA samples derived from GC collected from follicles at different developmental stages and CL from day 5 of the estrous cycle. For these analyses, mRNAs were reverse-transcribed into cDNAs, separated on agarose gel, and used to generate membranes that were hybridized to cloned SSH cDNA fragments described in Table 1. Results for CYP19, INHBA, CX43, ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3 (ARFGAP3), proteoglycan-1 (PRG1), replication protein A2 (RPA2) and tribbles homolog 2 (TRB2) mRNA expression are shown in Figure 3. The CYP19 and INHBA, known to be down-regulated by LH/hCG, served as controls to validate the virtual Northern analyses. CYP19 mRNA was mainly expressed in the DF with a 7.5-fold higher

expression level compared to SF. Treatment with hCG decreased CYP19 expression to background level in OF when compared to DF, and CYP19 expression was undetectable in CL (Figure 3A). The INHBA mRNA also increased by 4-fold from the SF to DF groups whereas hCG down-regulated its expression to background level in OF and in CL (Figure 3A). Expression of CX43 mRNA increased by 2.4-fold from the SF to DF groups. It was reduced by 16-fold in hCG-stimulated OF compared to DF and expression remained at a similar level in CL than in OF (Figure 3B). The expression level of ARFGAP3 mRNA was highest in DF compared to other samples, and was reduced by 3-fold in OF (Figure 3C). The PRG1 mRNA was expressed at highest level in SF, decreased in DF and was significantly reduced by 8-fold in OF compared to DF whereas expression level remained low in CL (Figure 3D). The RPA2 mRNA expression was 4-fold higher in DF compared to SF, and following treatment with hCG, expression was down-regulated by at least 11-fold and reached background level in OF and CL. Transcripts of 5 kb and 2.1 kb were observed and their pattern of expression were identical between groups (Figure 3E). The expression of TRB2 mRNA was mainly detected in SF and DF. In hCG-stimulated OF, expression level was down-regulated by at least 24-fold and remained at background level in CL (Figure 3F).

The expression of FSHr and FST mRNA were compared by RT-PCR since they presented weak signals by virtual Northern analysis (data not shown). The analysis of CYP19 was performed as a positive control for higher expression in the DF compared to the hCG-stimulated OF. Comparative RT-PCR analysis for CYP19 expression between follicle groups mirrored results obtained by virtual Northern

analysis (Figure 3) where hCG down-regulated CYP19 mRNA in OF compare to DF (Figure 4). Comparison of FSHr mRNA levels showed no significant difference in DF compared to SF, but was reduced by 6-fold following hCG treatment in OF and was undetectable in CL (Figure 4). Additionally, we compared the expression of the luteinizing hormone receptor (LHr) mRNA since it has been shown to be down-regulated by LH/hCG at the time of ovulation in the rat (28) and was not identified in the DF-OF subtracted cDNA library index (Table 1). We observed that the LHr mRNA was induced by 16-fold in DF compared to SF, was down-regulated by 10-fold in hCG-stimulated OF, and thereafter expression increased in the developing CL. Oligonucleotides used in RT-PCR analyses for the LHr encompassed exons 2 to 11 and resulted in amplification of two cDNA fragments. These LHr transcripts showed a similar trend of expression between groups (Figure 4). They were further characterized by cloning and sequencing. The highest molecular weight PCR product was identical to the characterized full-length bovine LHr (19; GenBank accession number U20504) whereas the lower molecular weight PCR product corresponded to a LHr transcript that lacked exon 10. The latter nucleotide sequence was deposited in GenBank (accession number AY651759). The expression of FST mRNA showed no significant difference between DF and SF groups but was reduced by 1.7-fold in hCG-treated OF and was undetectable in CL (Figure 4).

## Discussion

The preovulatory LH surge induces changes in different compartments of the ovarian follicle that triggers ovulation, induces maturation of the cumulus cells oocyte complex, and the differentiation of GC into luteal cells. Molecular mechanisms abrogating the development of the DF and ensuring its transition into an OF are not understood. To further our understanding of the molecular basis involved in the transition of a DF into an OF, we performed an SSH screen designed to identify genes down-regulated in GC of DF during hCG-induced ovulation. We used the SSH technical platform since it is not restricted to known genes as in cDNA array screens thereby allowing the identification of known and unknown genes (11). The comparisons of CYP19 and PGHS2 mRNA levels as control genes in the DF and OF groups validated the physiological model, as well as the SSH and the differential screening procedures that were used herein. SSH successfully identified genes that were known to be down-regulated in GC by LH/hCG, and allowed the discovery of genes that were unknown to be expressed in GC and/or modulated by LH/hCG. Screening of the DF-OF subtracted cDNA library identified genes that were known to be expressed in GC like, ApoER2, CPD, CYP11A, CYP19, CX43, FSHr, FST, INHBA, and SERPINE2 (Table 1). Some of the latter were already known to have their mRNA modulated by LH/hCG in GC of bovine ovarian follicles. For instance, CYP19 transcript was the second most predominant cDNA clone identified. CYP19 expression in GC is responsible for the transformation of androgens produced by theca cells into E2. Aromatase is a major marker for non-atretic growing DF as demonstrated by its capacity to synthesize and secrete greater amounts of E2 than

subordinates follicles (23,29, 30-33). CYP19 mRNA expression as well as E2 synthesis is known to decrease in DF following LH/hCG treatment (23,24). The serine and cysteine protease inhibitor, SERPINE2, was shown to be expressed at higher level in DF and reduced following LH/hCG (12,23). The CYP11A enzyme controls the first and limiting step of steroid biosynthesis converting cholesterol to pregnenolone and is under hormonal control through the cAMP signaling pathway (34). A decrease in CYP11A mRNA in GC was reported following the preovulatory LH surge in cattle (25) or hCG injection in monkeys (35). Expression of ApoER2, the third most frequently identified cDNA in the DF-OF subtracted library, and CPD mRNAs, were recently shown to be up-regulated in GC of bovine DF (23,32). Furthermore, Fayad et al. (23) reported that ApoER2 and CPD mRNAs were down-regulated in GC of hCG-stimulated OF. The published observations on SERPINE2, CYP11A, ApoER2 and CPD are consistent with those reported here for the characterization of the DF-OF cDNA subtracted library.

CX43 is a member of the gap junctional subunits, named connexins. Among gap junctional proteins identified in GC, CX43 is important for normal follicular development since folliculogenesis in CX43-deficient mice stops at the primary follicular stage (36,37). In the bovine species, follicular localization of CX43 was restricted to GC at all follicular stages, was increased in the course of follicular growth and decreased in atretic follicles (27,38). These observations corroborate the increase in CX43 mRNA expression detected herein in DF compare to SF. Expression and phosphorylation of CX43 is hormonally regulated by FSH (39-42). However, the development of the DF is concomittant to a decrease in circulating FSH

concentration in cattle (5,6). In rat ovary, increases in CX43 mRNA and protein were observed following E2 treatments (43). Collectively, these results suggest that increase in E2 production by the DF could stimulate increase in CX43 expression, which insures metabolic coupling between GC of a growing DF to prevent atresia. Conversely, the LH/hCG surge would abrogate GC coupling contributing to ovulation and luteinization.

The INHBA was the most predominant cDNA clone identified in the DF-OF subtracted library. Activin is produced by GC and acts in a paracrine/autocrine fashion to sustain follicular development. Inhibin and FST also produced by GC control at the extracellular level the stimulatory actions of activin on follicle growth and steroidogenesis (44-46). Spatio-temporal expression studies showed higher mRNA level for INHBA in estrogen active follicles (23,32,47,48) compared to small follicles, and increase in activin-A protein secreted in follicular fluid (49). Activin was shown to promote GC proliferation and steroidogenesis and to potentiate FSH actions on GC by increasing FSHr expression (50-52). These results support the hypothesis that activin-A contributes to the development of the DF through paracrine action and that the preovulatory LH/hCG surge abrogates its expression. No difference in FST mRNA expression was found in DF compared to SF, the results of which are consistent with no difference FST protein concentration in follicular fluid (53). FST is known to bind activin with high affinity preventing activin action on GC (54). Transgenic mice overexpressing (55) or deficient in FST (56) presented a decrease in follicular development. Collectively, these observations support a pivotal role for activin in GC proliferation and differentiation whereas FST would act as a

modulator of activin action. Meanwhile, at the time of ovulation, FST mRNA expression decreased in hCG-stimulated OF and was not detected in CL, which is consistent with observations in rats (57). A reduced level of FST expression in OF while INHBA mRNA expression was dramatically down-regulated would contribute to neutralize extracellular activin at the time of ovulation thereby concurring to differentiation of GC into luteal cells.

The FSHr cDNA was identified in the DF-OF subtracted library, and further evidence of down-regulation by hCG in OF compared to DF and SF was provided by RT-PCR analysis. Conversely, FSHr mRNA level in GC did not differ between SF and DF. These observations are in agreement with our understanding that the SF (2-4 mm) require expression of the FSHr by the GC to allow their recruitment by the increase in circulating FSH (2,4), which occurs two or three times during the bovine estrous cycle (5,6). The similarity in the expression profiles of the FSHr in the SF and DF groups is in accord with the concept that the FSHr may contribute to but is not responsible for the establishment and/or the maintenance of the DF when concentrations of circulating FSH decrease during the growth of the DF (5,6,31). Decrease of FSHr expression in GC following the gonadotropins preovulatory surge concurs with the initiation of GC luteinization and with the observation that FSHr mRNA decreases in cultured bovine GC with increasing concentration of FSH (21). The LHr cDNA was not identified in the DF-OF subtracted library and the exact explanation is unknown but could be related to its low level of expression in GC, to the limited number of cDNA clones analyzed, to the detection limits of the differential screening procedure of the subtracted library or to the presence of

isoforms between groups that modifies the kinetics of hybridization during SSH. The full-length LHr expression in GC was thus compared by RT-PCR, and allowed the characterization of a truncated LHr isoform that lacks exon 10. The latter was identified in the bovine CL and referred to the LHr isoform F (58). In GC and CL, the mRNA coding for the LHr lacking exon 10 is expressed at a lower level compared to the full-length LHr. In vitro expression studies have shown that human LHr lacking exon 10 is able to bind LH but the production of cAMP is impaired drastically when stimulated by LH (59). Collectively, these results suggest that the biological function of the LHr lacking exon 10 could modulate LH signaling in GC of DF and CL according to variations in circulating concentrations of LH due to its pulsatile nature. The LHr mRNAs were not detected in GC of SF but observed in DF. Thus, expression of LHr in GC of DF contributes to the development and maintenance of the DF ensuring its survival on LH when circulating FSH is low (33,60,61). The analysis confirmed that LHr mRNA were reduced in hCG-stimulated OF, which conforms with observations during the periovulatory period in other species (8,28).

A last group of characterized cDNAs were identified in the DF-OF subtracted library as being modulated by hCG, and to our knowledge, have not been shown previously to be expressed in the ovarian follicle. Among these, ARFGAP3, PRG1, RPA2 and TRB2 represent novel candidate genes associated with follicular growth and dominance. The expression pattern of ARFGAP3, PRG1, RPA2 and TRB2 mRNAs in GC were validated by virtual Northern analysis and were shown to be modulated by hCG. For instance, PRG1 also known as serglycin, was identified five times in the DF-OF library, and its transcript size estimated at 1.4 kb which is similar

to the human transcript (62). PRG1 is a member of the small proteoglycan (PG) family characterized by repeat sequences of serine and glycine amino acids on which the serine residues serve as attachment sites for glycosaminoglycans (GAG). The type and length of GAG attached to the protein core may differ between cell types (63,64). PGR1 was first characterized in cytoplasmic secretory granules of haematopoietic cells but was detected in other cell types (62,65-68). It was found complexed to physiologically important secretory proteins that are released either by the regulated secretory pathway or constitutive pathway (63,64). Many biological roles were attributed to PG in the control of growth and differentiation: cell attachment and migration; binding and regulation of growth factors; binding to proteolytic enzymes and proteases inhibitors (63,64). It is known that PG are produced by bovine GC, stimulated by FSH, and secreted in follicular fluid (69,70). Bovine follicular fluid collected from small antral follicles contain PG forms that differ from that of large antral follicles, meanwhile, the identity of PG protein cores were not determined (71,72). In agreement with these observations, we showed that PRG1 mRNA is expressed at higher level in SF compared to DF, and its expression is drastically diminished following hCG injection. Moreover, mRNA for chondroitin sulfate proteoglycan-2 (CSPG2) also known as versican, was expressed at higher levels in GC of DF compared to SF (23). Thus, mRNA expression coding for two protein cores of PG in GC, PRG1 and CSPG2, was shown to vary in relation to follicular growth and ovulation. These results concord with the observation of the variable nature of GAG purified from follicular fluid in relation to follicular development (71,72).

ARFGAP3 mRNA expression was reduced in GC of hCG-stimulated OF compared to DF. ARFGAP3 is a recently characterized member of the ADP-ribosylation factor (ARF) family of small GTPases (73,74) that cycles between a GDP-bound, inactive and a GTP-bound, active form (75,76). In general, ARFGAP proteins are involved in intracellular trafficking of proteins through vesicular transport and signal transduction events. However, ARFGAP3 biological function is not yet defined. ARFGAP3 expression was analyzed by mRNA dot-blotting of human tissues, which revealed high expression in endocrine tissues, for instance, the testis. Expression of ARFGAP3 in total human ovarian extract was also detected but the physiological status of the ovary was not mentioned (74). Based on the limited information available on the biological function of ARFGAP3, higher expression of ARFGAP3 in GC of DF could be interpreted as an increase in membrane trafficking and/or signalling activities in growing DF compared to other follicular stages.

The replication protein A (RPA) is a heterotrimeric protein consisting of a 70- (RPA1), 30- (RPA2), and 14 (RPA3)-kDa subunits that is required for DNA replication, recombination, and repair (77). RPA has also been implicated in the regulation of apoptosis and transcription (78). RPA is phosphorylated in a cell cycle-dependent manner, beginning at the G1/S transition and extending until late mitosis, and in response to DNA damage. RPA binds single-stranded DNA and specifically interacts with multiple proteins involved in DNA metabolism. Two transcripts of 2.1 kb and 5 kb were observed for bovine RPA2. The 2.1 kb corresponds to the 1.7 kb human cDNA (GenBank : BC021257) but the 5 kb isoform may represent an unspliced higher molecular weight form. However, mRNA expression studies by

Northern analysis has not been reported in other species. Expression of bovine RPA2 mRNA was found at highest level in GC of DF and down-regulated by hCG in OF. The biological role of RPA in cell growth and survival is in accordance with the high level of expression observed in developing bovine DF. Interestingly, Menin (MEN1), a tumor suppressor gene that is expressed in the ovary (79), was recently found to interact with RPA2 and to overlap RPA2 localization in the nucleus (80). Thus, RPA2 and MEN1 may contribute to preventing atresia in the developing DF.

TRB2 was found to be expressed in GC of SF and DF but down-regulated by hCG in OF. In humans, TRB1, 2 and 3 represent novel atypical members of the serine/threonine protein kinase superfamily (81,82) and are homologs of *Drosophila* Tribbles (83-85). In mammals, the three TRB proteins share a central TRB domain that lacks key residues required for kinase activity, and their amino and carboxy termini sequences are not related to each other (81-83,86)). TRBs were shown to bind and inhibit members of the mitogen-activated kinase kinase (MAPKK) family, the serine-threonine kinase AKT (also called protein kinase B), thereby controlling MAPKs signalling pathways (82,87,88). TRB mRNAs are rapidly induced by mitogens, have short half-life and were shown to be expressed differentially in the tissues analyzed (81,82,89). TRB2 mRNA expression in canine thyroid cell was up-regulated by TSH (89). In *Drosophila*, Tribbles controls String/CDC25 phosphatase that is required for the progression of G2 cell cycle stage into mitosis. Thus, Tribbles plays a key role in coordinating mitosis and morphogenesis. For instance, modification of Tribbles expression in *Drosophila* alters fertility (83-85). These studies suggested that Tribbles may act as a proliferation brake by controlling

String/CDC25 phosphatase activity. Although the known biological function of TRB2 is still limited, cumulatively, these observations suggest that TRB2 would modulate MAPK signaling pathways in response to incoming extracellular signals that include hormones and growth factors. We hypothesize that TRB2 could act as a modulator of GC proliferation in growing antral follicles. Clearly, more research is needed to understand the biochemistry and TRB2 biological function in GC signalling mechanisms.

Several genes for which expression is differentially regulated in DF and OF during the periovulatory period were identified in this study. Identification and confirmation of known genes that are expressed in GC of DF like CYP19, CX43, FST, FSHr, INHBA, LHr, SERPINE2, but that are down-regulated in hCG-treated OF support the validity of our in vivo experimental model and the use of SSH as the method of analysis. Identification of novel genes like ARFGAP3, PRG1, RPA2 and TRB2 contributes important information towards understanding the mechanisms involved in ovarian follicular growth, ovulation and luteinization. Other cDNAs were identified that correspond to uncharacterized cDNAs/BAC clones or novel sequences and will require cloning of their full-length cDNA and analysis of their spatio-temporal expression in follicles.

## **Acknowledgments**

This work was supported by a Discovery Grant to J.G.L. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), a CORPAQ grant from the “Ministère de l’agriculture, des pêcheries et de l’alimentation du Québec”

and a FQRNT grant from “le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies”. The authors thank Mrs. Manon Salvas for her technical assistance during nucleic acid sequencing, and Dr. Christine Theoret (Université de Montréal) for constructive comments to the manuscript.

## References

1. **Lussier JG, Matton P, and Dufour JJ.** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 81:301-307, 1987.
2. **Lussier JG, Matton P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, and Carruthers TD.** Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J Reprod Fertil* 102:95-105, 1994.
3. **Markström E, Svensson E Ch, Shao R, Svanberg B, and Billig H.** Survival factors regulating ovarian apoptosis—dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123:23–30, 2002.
4. **Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, and Webb R.** Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 55:68-74, 1996.
5. **Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, and Turzillo AM.** Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 65:648-654, 2001.
6. **Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, and Kot K.** Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 65:638-647, 2001.
7. **Sirois J.** Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135:841-848, 1994.
8. **Richards JS, Russell DL, Ochsner S, and Espey LL.** Ovulation: New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 64:69-92, 1994.
9. **Hennebold JD.** Characterization of the ovarian transcriptome through the use of differential analysis of gene expression methodologies. *Hum Reprod Update* 10:227-239, 2004.
10. **Lévesque V, Fayad T, Sirois J, Silversides DW, and Lussier JG.** Identification of hCG-induced gene expression in granulosa cells of bovine preovulatory follicles using suppressive subtractive hybridization. *Biology of Reproduction 35th SSR Meeting, Baltimore, MD. Biol Reprod* 66 Suppl 1: abst 275, 2002.
11. **Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y-F C, and Siebert PD.** Suppression subtractive hybridization : A versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303:349-379, 1999.
12. **Bédard J, Brûlé S, Price CA, Silversides DW, and Lussier JG.** Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Molec Reprod Dev* 64:152-165, 2003.
13. **Sambrook J and Russell DW.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
14. **Endege WO, Steinmann KE, Boardman LA, Thibodeau SN, and Schlegel R.** Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 26:542-550, 1999.
15. **Zhumabayeva B, Diatchenko L, Chenchik A, and Siebert PD.** Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques* 30:158-163, 2001.

16. **Hinshelwood MM, Corbin CJ, Tsang PC, and Simpson ER.** Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 133:1971-1977, 1993.
17. **Liu J, Antaya M, Goff AK, Boerboom D, Silversides DW, Lussier JG, and Sirois J.** Molecular characterization of bovine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation in uterine stromal cells. *Biol Reprod* 64:983-991, 2001.
18. **Lévesque V, Fayad T, Ndiaye K, Nahé Diouf M, and Lussier JG.** Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* 35:72-78, 2003.
19. **Lussier JG, Sirois J, Price C, Carrière P, and Silversides DW.** Research in genomics applied at the undergraduated level: When research meets teaching objectives. *Biology of Reproduction 34th SSR Meeting, Ottawa, ON. Biol Reprod* 64(Suppl 1): Abst 71, 2001.
20. **Houde A, Lussier JG, Ethier JF, Gagnon C, and Silversides DW.** Cloning and tissue expression of bovine follistatin cDNA. *Mol Reprod Dev* 37:391-397, 1994.
21. **Houde A, Lambert A, Saumande J, Silversides DW, and Lussier JG.** Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Mol Reprod Dev* 39:127-135, 1994.
22. **JMP.** Software for statistical visualization on the Apple McIntosh. Version 2. SAS Institute Inc. Cary, NC, 1989.
23. **Fayad T, Lévesque V, Sirois J, Silversides DW, and Lussier JG.** Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* 70: 523-533, 2004.
24. **Komar CM, Berndtson AK, Evans ACO, and Fortune JE.** Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for P450 aromatase and P450 17  $\alpha$ -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 64:1797-1805, 2001.
25. **Voss AK and Fortune JE.** Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 132:888-894, 1993.
26. **Juengel JL, Imakawa K, Farin PW, Youngquist RS, Roberts RM, Smith MF, and Garverick HA.** Detection of mRNA for inhibin alpha- and beta A-subunits in bovine ovarian tissues and the effect of in vivo administration of GNRH. *Domest Anim Endocrinol* 10:207-218, 1993.
27. **Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, and Fléchon JE.** Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev* 57:60-66, 2000.
28. **Segaloff DL, Wang HY, and Richards JS.** Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4:1856-1865, 1990.
29. **Ireland JJ and Roche JF.** Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 112:150-156, 1983.
30. **Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, and Youngquist RS.** Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain

- cleavage, cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology* 136:981-989, 1995.
31. **Mihm M, Good TEM, Ireland JLH, Ireland JJ, Knight PG, and Roche JF.** Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod* 57:1328-1337, 1997.
32. **Sisco B, Hagemann LJ, Shelling AN, and Pfeffer PL.** Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology* 144:3904-3913, 2003.
33. **Evans ACO, Ireland JL, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM, and Ireland JJ** Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod* 70:1475-1484, 2004.
34. **Niswender GD.** Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 123:333-339, 2002.
35. **Chaffin CL, Dissen GA, and Stouffer RL.** Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys. *Mol Hum Reprod* 6:11-18, 2000.
36. **Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, and Kidder GM.** Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biol Reprod* 60:1263-1270, 1999.
37. **Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, and Kidder GM.** Intercellular communication via connexin-43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol* 233:258-270, 2001.
38. **Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, and Grazul-Bilska AT.** Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32 and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine* 10:43-51, 1999.
39. **Granot I and Dekel N.** Developmental expression and regulation of the gap junction protein and transcription in rat ovaries. *Mol Reprod Dev* 47:231-239, 1997.
40. **Lenhart JA, Downey BR, and Bagnell CA.** Connexin 43 gap junction protein expression during follicular development in the porcine ovary. *Biol Reprod* 58:583-590, 1998.
41. **Sommersberg B, Bulling A, Salzer U, Frohlich U, Garfield RE, Amsterdam A, and Mayerhofer A.** Gap junction communication and connexin-43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 63:1661-1668, 2000.
42. **Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Bilski JJ, and Grazul-Bilska AT.** Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 18:261-270, 2002.
43. **Wiesen JF and Midgley AR Jr.** Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biol Reprod* 50:336-348, 1994.
44. **Wrathall JH and Knight PG.** Effects of inhibin-related peptides and estradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *J Endocrinol* 145:491-500, 1995.
45. **Woodruff TK.** Regulation of cellular and system function by activin. *Biochem Pharmacol* 55:953-963, 1998

46. **Welt C, Sidis Y, Keutmann H, and Schneyer A.** Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med* 227:724-752, 2002.
47. **Ireland JL and Ireland JJ.** Changes in expression of inhibin/activin alpha, beta A and beta B subunit messenger ribonucleic acids following increases in size and during different stages of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows. *Biol Reprod* 50:492-501, 1994.
48. **Sunderland SJ, Knight PG, Boland MP, Roche JF, and Ireland JJ.** Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 54:453-462, 1996.
49. **Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, and Kot K.** Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor 1 in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biol Reprod* 67:14-19, 2002.
50. **Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, and Igarashi M.** Induction of follicle-stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 156:668-674, 1988.
51. **Xiao S, Robertson DM, and Findlay JK.** Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131:1009-1016, 1992.
52. **Li R, Phillips DM, and Mather JP.** Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology* 136:849-856, 1995.
53. **Knight PG and Glister C.** Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 78:165-183, 2003.
54. **Glister C, Kemp CF, and Knight PG.** Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127:239-254, 2004.
55. **Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo FJ, and Matzuk MM.** Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 12:96-106, 1998.
56. **Jorgez CJ, Klysik M, Jamin SP, Behringer RR, and Matzuk MM.** Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol Endocrinol* 18:953-967, 2004.
57. **Ogawa K, Kurohmaru M, Sugino H, and Hayashi Y.** Changes in the immunoreactivity of follistatin within preovulatory follicles after the primary gonadotrophin surge in rats. *J Reprod Fertil* 101:577-481, 1994.
58. **Kawate N and Okuda K.** Coordinated expression of splice variants for luteinizing hormone receptor messenger RNA during the development of bovine corpora lutea. *Mol Reprod Dev* 51:66-75, 1998.
59. **Müller T, Gromoll J, and Simoni M.** Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2242-2249, 2003.
60. **Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, and Youngquist RS.** Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor,

- cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 56:1158-1168, 1997.
61. **Evans AC and Fortune JE.** Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138:2963-2971, 1997.
62. **Stevens RL, Avraham S, Gartner MC, Bruns GAP, Austen K F, and Weis JH.** Isolation and characterization of a cDNA that encodes the peptide core of the secretory granule proteoglycan of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 263: 7287-7291, 1988.
63. **Kolset SO, Prydz K, and Pejler G.** Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 379 :217-227, 2004.
64. **Prydz K and Dalen KT.** Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113:193-205, 2000.
65. **Yao YQ, Xu JS, Lee WM, Yeung WS, and Lee KF.** Identification of mRNAs that are up-regulated after fertilization in the murine zygote by suppression subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 304:60-66, 2003.
66. **Schick BP, Ho HC, Brodbeck KC, Wrigley CW, and Klimas J.** Serglycin proteoglycan expression and synthesis in embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1593:259-267, 2003.
67. **Biederbick A, Licht A, and Kleene R.** Serglycin proteoglycan is sorted into zymogen granules of rat pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol* 82:19-29, 2003.
68. **Keith Ho HC, McGrath KE, Brodbeck KC, Palis J, and Schick BP.** Serglycin proteoglycan synthesis in the murine uterine decidua and early embryo. *Biol Reprod* 64:1667-1676, 2001.
69. **Bellin ME, Lenz RW, Steadman LE, and Ax RL.** Proteoglycan production by bovine granulosa cells in vitro occurs in response to FSH. *Mol Cell Endocrinol* 29:51-65, 1983.
70. **Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, and Hascall VC.** Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum Reprod Update* 5:293-301, 1999.
71. **Grimek HJ, Bellin ME, and Ax RL.** Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 30:397-409, 1984.
72. **McArthur ME, Irving-Rodgers HF, Byers S, and Rodgers RJ.** Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. *Biol Reprod* 63:913-924, 2000.
73. **Liu X, Zhang C, Xing G, Chen Q, and He F** Functional characterization of novel human ARFGAP3. *FEBS Lett* 490:79-83, 2001.
74. **Zhang C, Yu Y, Zhang S, Liu M, Xing G, Wei H, Bi J, Liu X, Zhou G, Dong C, Hu Z, Zhang Y, Luo L, Wu C, Zhao S, and He F.** Characterization, chromosomal assignment, and tissue expression of a novel human gene belonging to the ARF GAP family. *Genomics* 63:400-408, 2000.
75. **Donaldson JG.** Filling in the GAPS in the ADP-ribosylation factor story. *Proc Natl Acad Sci US A* 97:3792-3794, 2000.
76. **Chavrier P and Goud B.** The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 11:466-475, 1999.

77. **Wold MS.** Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66:61-92, 1997.
78. **Iftode C, Daniely Y, and Borowiec JA.** Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34:141-180, 1999.
79. **Stewart C, Parente F, Piehl F, Farnebo F, Quincey D, Silins G, Bergman L, Carle GF, Lemmens I, Grimmond S, Xian CZ, Khodei S, Teh BT, Lagercrantz J, Siggers P, Calendar A, Van de Vem V, Kas K, Weber G, Hayward N, Gaudray P, and Larsson C.** Characterization of the mouse *Men1* gene and its expression during development. *Oncogene* 17:2485-2493, 1998.
80. **Sukhodolets KE, Hickman AB, Agarwal SK, Sukhodolets MV, Obungu VH, Novotny EA, Crabtree JS, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, and Marx SJ.** The 32-kilodalton subunit of replication protein A interacts with menin, the product of the MEN1 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biol* 23:493-509, 2003.
81. **Wilkin F, Suarez-Huerta N, Robaye B, Peetermans J, Libert F, Dumont JE, and Maenhaut C.** Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *Eur J Biochem* 248:660-668, 1997.
82. **Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill LA, Qwarnstrom EE, and Dower SK.** Human tribbles: A protein family controlling mitogen activated protein kinase cascades. *J Biol Chem Aug 6 [Epub ahead of print]*, 2004.
83. **Seher TC and Leptin M.** Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 10:623-629, 2000.
84. **Mata J, Curado S, Ephrussi A, and Rorth P.** Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell*. 101:511-22, 2000.
85. **Grosshans J and Wieschaus E.** A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 101:523-531, 2000.
86. **Mayumi-Matsuda K, Kojima S, Suzuki H, and Sakata T.** Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 258:260-264, 1999.
87. **Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, and Montminy M.** PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 10:530-534, 2004.
88. **Du K, Herzig S, Kulkarni RN, and Montminy M.** TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300:1574-1577, 2003.
89. **Wilkin F, Savonet V, Radulescu A, Petermans J, Dumont JE, and Maenhaut C.** Identification and characterization of novel genes modulated in the thyroid of dogs treated with methimazole and propylthiouracil. *J Biol Chem* 271:28451-28457, 1996.

**Figure 1. Analyses of the cDNA subtraction efficiency.**

PCR analysis was performed on the indicated samples using CYP19 or PGHS2 specific primers, as described under “Materials and Methods”. PCR product aliquots were collected at increasing number of PCR cycles as indicated. The CYP19 DNA fragment (520 pb) was detected following 13 PCR cycles in the DF-OF subtracted sample but not until 18 PCR cycles in the corresponding unsubtracted DF sample. The PGHS2 DNA fragment (418 bp) was detected following 13 PCR cycles in the OF-DF subtracted sample but not until 18 PCR cycles in the corresponding unsubtracted OF sample. CYP19 or PGHS2 were not detected in the OF or DF samples, respectively.



Figure 1

**Figure 2. Representative differential screening results by macro-arrays of the DF-OF subtracted cDNA library.**

PCR-amplified cDNA fragments obtained by SSH were dot blotted to generate four identical sets of membranes. The macro-arrays were then hybridized with four different probes: subtracted DF-OF cDNAs (A), unsubtracted DF cDNAs (B), reverse-subtracted OF-DF cDNAs (C), and unsubtracted OF cDNAs (D), as described under "Materials and Methods". The two upper left dots for each membrane served as internal hybridization controls: A1 = CYP19 (positive control for the forward reaction; DF-OF), and A2 = PGHS2 (positive control for the reverse reaction; OF-DF). The cDNAs clones that were found to be differentially expressed in the DF-OF membrane following comparison of hybridization signals among the four membranes were further characterized by sequencing. In this example, differentially expressed cDNA clones (*i.e.* positive clones) corresponded to : ApoER2 (C9, G1, H3, H12), INHBA (C1, E1, F1, F11, H2, H9), RPA2 (C3), Mus musculus cDNA from adult male urinary bladder (C2), TBR2 (E10), and sequences with no match in Genbank (C8: GenBank accession number CF929638; and D6, G11, H5: GenBank accession number CF929639).

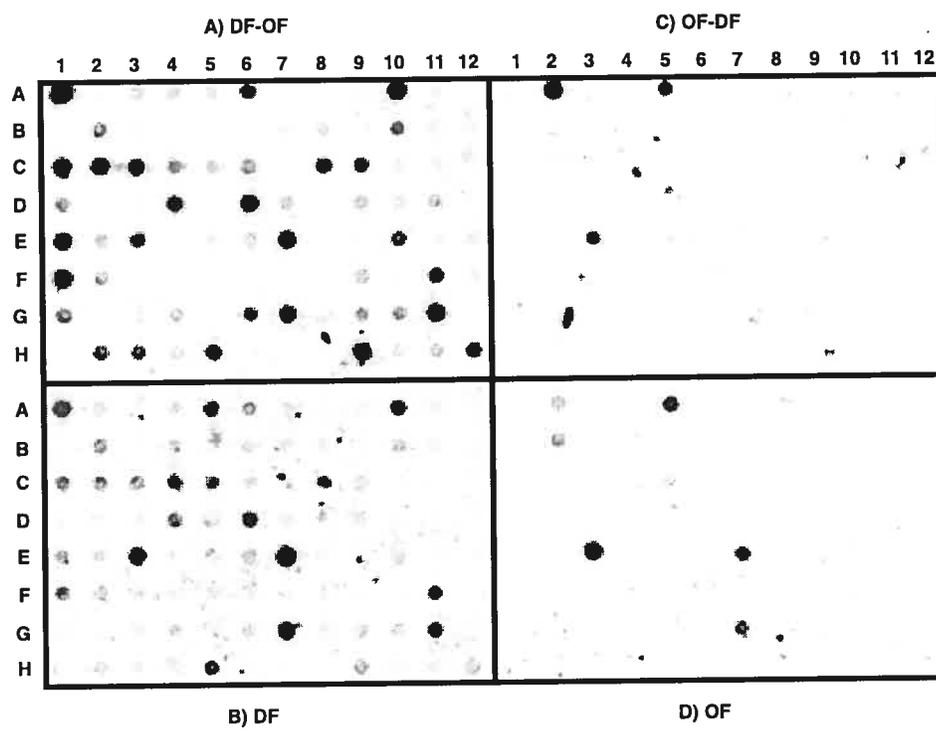


Figure 2

**Table 1.** Identity of cDNA clones found to be differentially expressed by SSH in bovine granulosa cells of DF compared to OF

**TABLE 1. Identity of cDNA clones found to be differentially expressed by SSH in bovine granulosa cells of DF compared to OF.**

Sequence identification	Frequency	Accession Number	% identity <sup>a</sup>	Expected E value	Description <sup>b</sup>
ANAPC5	1	NM_016237	90%	$e^{-117}$	HS anaphase promoting complex subunit 5
ApoER2	15	XM_016537	93%	$e^{-126}$	HS mRNA apolipoprotein E receptor 2
ARFGAP3	2	NM_014570	85%	$7e^{-22}$	HS ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3
CPD	1	U65090	93%	$e^{-147}$	HS carboxypeptidase D
CX43	9	NM_174068	99%	0	BT vascular smooth muscle connexin 43
CYP11A	2	NM_176644	96%	0	BT cytochrome P450 side-chain cleavage
CYP19	16	NM_174305	98%	0	BT cytochrome P450 aromatase, family XIX
FAD104	1	AB098597	94%	$e^{-162}$	HS FAD104
FST	3	M19529	99%	$2e^{-92}$	SS follistatin
FSHR	2	L22319	99%	0	BT follicle stimulating hormone receptor
INHBA	47	NM_174363	99%	$e^{-173}$	BT inhibin, beta A (activin A, activin AB)
JAK3	2	BC028068	88%	$3e^{-18}$	HS Janus kinase 3
Jpx	1	AJ421481	99%	$e^{-170}$	BT X-inactivation center region Jpx & Xist genes
MTPN	1	NM_145808	81%	$2e^{-19}$	HS myotrophin
NAD <sup>+</sup> -DID	3	U07980	98%	0	BT NAD <sup>+</sup> -dependent isocitrate dehydrogenase subunits 3 and 4
PRC1	1	BC003138	87%	$3e^{-30}$	HS protein regulator of cytokinesis 1
PRG1	5	BC015516	80%	$4e^{-12}$	HS proteoglycan 1
RPA2	1	BC021257	91%	$e^{-28}$	HS replication protein A2
RPS26	1	XM_017661	94%	$4e^{-52}$	H.S. ribosomal protein S26
SCD	1	NM_173959	98%	$e^{-127}$	BT stearyl-coenzyme A desaturase

SERPINE2	7	AF251153	98%	0	BT serine protease inhibitor-E2
SYT	1	NM_005637	93%	$e^{-155}$	HS synovial sarcoma translocation (SS18)
TRB2	8	NM_178317	99%	0	BT tribbles homolog 2
cDNA	17	AK035610	90%	$e^{-101}$	MM adult male urinary bladder cDNA
cDNA	9	AB049896	(296/330) 88%	$6e^{-28}$	MF brain cDNA (clone: QnpA-19444)
cDNA	1	NM_152261	(115/130) 85%	$3e^{-39}$	HS hypothetical protein
cDNA	1	BC020522	(196/228) 91%	$2e^{-52}$	HS hypothetical protein
cDNA	1	AK024896	(164/179) 86%	$e^{-41}$	HS cDNA
EST	2	AW426800	(197/228) 97%	$e^{-105}$	BT cDNA MARC 3BOV
EST	1	BI774847	(227/232) 99%	0	BT cDNA MARC 1BOV
EST	1	CB170803	(340/341) 91%	$3e^{-98}$	BT cDNA from thyroid and parathyroid
EST	14	CF929638	(262/287) No match		BT EST new
EST	8	CF929639	No match		BT EST new
EST	2	CF929643	No match		BT EST new

a. % identity represents homology estimates of bovine SSH cDNA fragments with nucleotide sequences in GenBank databank (NR or EST) via BLAST search. Numbers in brackets represent the number of nucleotides of the SSH cDNA fragments that are identical with databank sequences. They are indicated only for the the cDNAs or ESTs of unknown biological function.

b. BT: *Bos taurus*; EC: *Equus caballus*; EST: expressed sequence tag; HS: *Homo sapiens*; MF: *Macaca fascicularis*; MM: *Mus musculus*; SS: *Sus scrofa*.

**Figure 3. Analysis of mRNA expression by virtual Northern blot.**

Total RNA was extracted from bovine GC collected from 2-4 mm follicles (SF), dominant follicles (DF) at day 5 of the estrous cycle, ovulatory follicles (OF) collected 22 to 23 h after injection of hCG and corpora lutea (CL) from day 5 of the estrous cycle, and were used in mRNA expression analyses using the virtual Northern technique as described under "Materials and Methods". GAPD was used as a control gene, and showed no significant difference in mRNA expression levels between groups. Gene-specific signals were normalized with corresponding GAPD mRNA signals (1.8 kb) for each sample, and relative values are reported as percent of expression detected in DF. **A)** Expression of CYP19 (5.2 kb) and INHBA (1.9 kb) mRNAs were higher in DF and were down-regulated by hCG in OF ( $P < 0.0001$ ); **B)** Expression of CX43 mRNA (3.7 kb) was 16-fold lower in OF than in DF ( $P < 0.0001$ ); **C)** Expression of ARFGAP3 mRNA (3.5 kb) was reduced by 3-fold in OF than in DF ( $P < 0.0001$ ); **D)** Expression of PRG1 mRNA (1.4 kb) was reduced by 8-fold in OF than in DF ( $P < 0.0001$ ); **E)** Transcripts of RPA2 mRNA detected at 5 kb and 2.1 kb were both down-regulated by hCG in OF compare to DF ( $P < 0.0001$ ); **F)** Transcripts of TRB2 mRNA at 3.6 kb was down-regulated in OF compare to DF ( $P < 0.0001$ ). Probability values for each one-way ANOVA analysis are specified above in parentheses. Different letters denote samples that are significantly different ( $P < 0.05$ ) when Tukey-Kramer multiple comparison tests were performed. Data are presented as least-square means  $\pm$  SEM, and the number of independent samples per group is indicated in parenthesis.

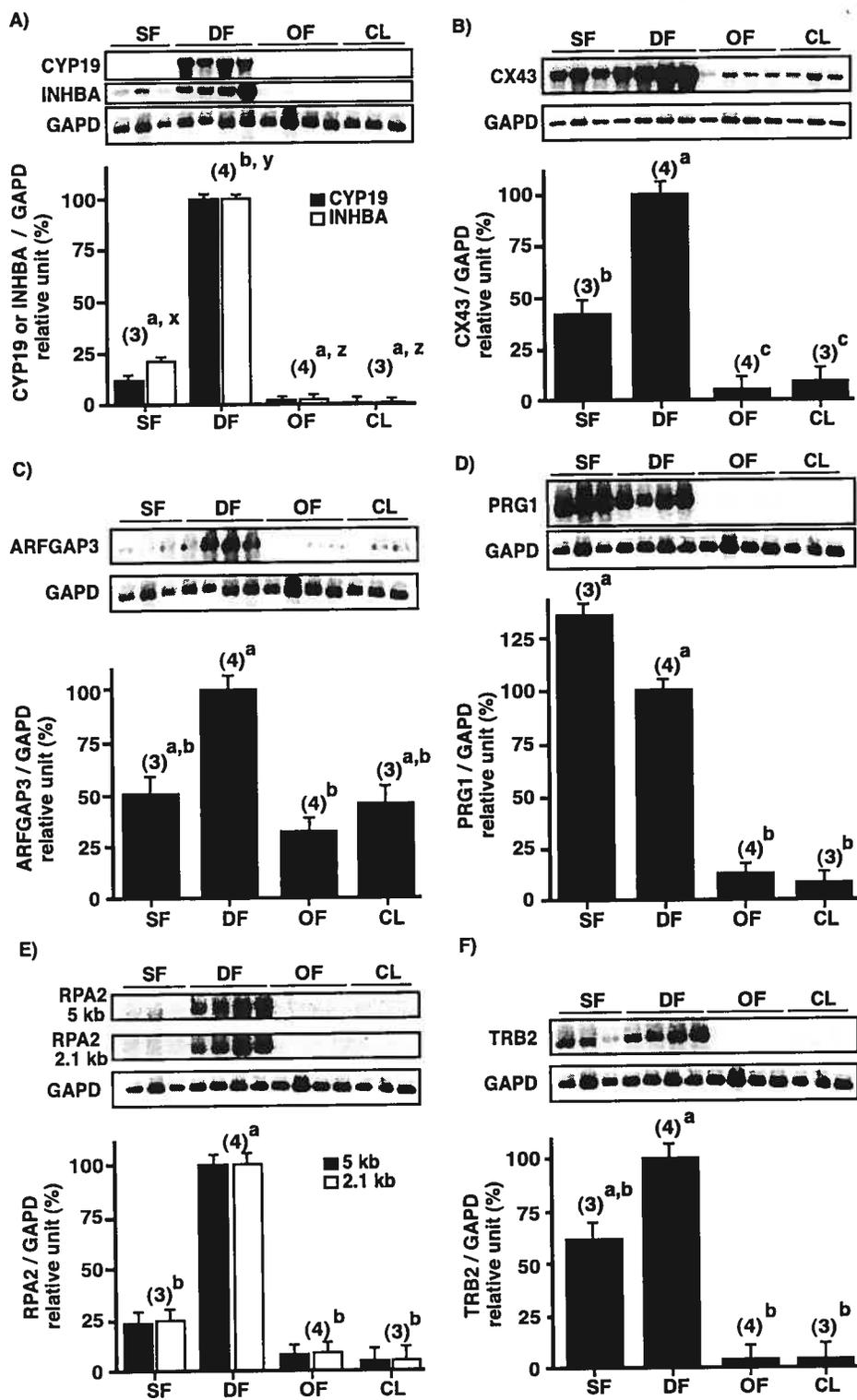


Figure 3

**Figure 4. Analysis of mRNA expression by RT-PCR.**

Total RNA was extracted from bovine GC collected from 2-4 mm follicles (SF), dominant follicles (DF) at day 5 of the estrous cycle, ovulatory follicles (OF) 22 to 23 h after injection of hCG (OF) and corpora lutea (CL) from day 5 of the estrous cycle, and were used in mRNA expression analyses using RT-PCR as described under "Materials and Methods". GAPD was used as a control gene, and showed no significant differences between groups. Gene-specific signals were normalized with corresponding GAPD signals for each sample. The analysis of CYP19 mRNA was performed as a positive control and was down-regulated in OF compared to DF ( $P < 0.0001$ ). Expression of the FSHr was reduced by 6 fold in OF ( $P < 0.0001$ ). The LHr was induced by 16 fold in DF compare to SF, was down-regulated by 10-fold in OF ( $P < 0.0001$ ). The higher molecular weight band corresponds to the full-length LHr mRNA (GenBank accession number: U20504) and the lower molecular weight form to the LHr lacking exon 10 (Genbank accession number: AY651759). FST mRNA was reduced by 1.7 fold in OF compare to DF ( $P < 0.006$ ). Probability values for each one-way ANOVA analysis are specified above in parenthesis. Different letters denote samples that are significantly different ( $P < 0.05$ ) when Tukey-Kramer multiple comparison tests were performed to compare group means for a specific gene. Data are presented as least-square means  $\pm$  SEM, and the number of independent samples per group is indicated in parenthesis.

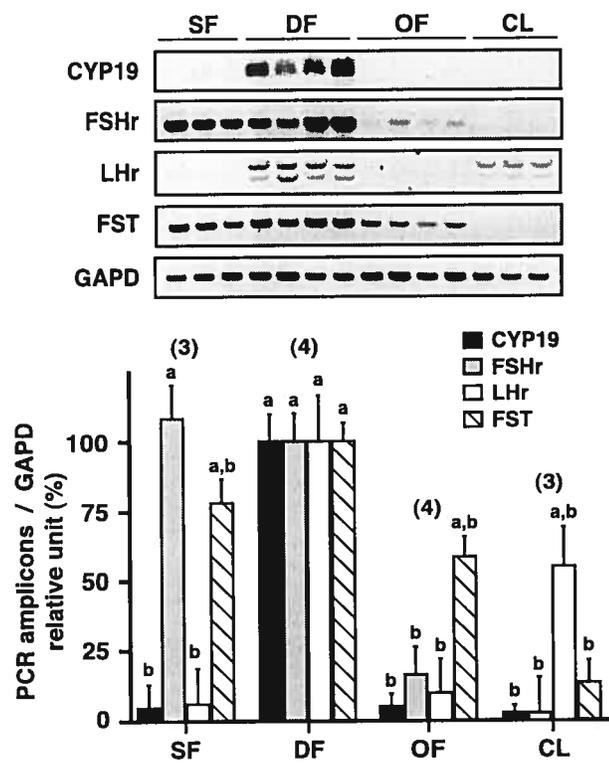


Figure 4

## **CHAPITRE 3**

**Caractérisation moléculaire de *Tribbles homolog 2* (TRB2) bovin et analyse de  
l'expression de l'ARNm dans les follicules ovariens**

Kalidou Ndiaye, David W. Silversides, Jean Sirois and Jacques G. Lussier.

Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

Key words: ovary, follicle, granulosa, gene expression, dominance, ovulation, TRB2.

## Résumé

L'établissement de la génothèque soustraite d'ADNc DF-OF de cellules de la granulosa (GC) par l'approche de l'hybridation soustractive suppressive a permis d'identifier un fragment d'ADNc correspondant à un membre de la famille des « *Tribbles homolog* » (TRB), soit TRB2. Ces résultats suggèrent que TRB2 serait différemment exprimé avec une diminution considérable de son expression dans les GC en période périovulatoire. L'objectif de ce travail fut de caractériser l'ADNc de TRB2 bovin et d'étudier le profil d'expression de son ARNm au cours du développement folliculaire et en période périovulatoire. L'ADNc de TRB2 est constitué de 3571 pb et code pour une protéine potentielle de 38.7 kDa correspondant à une sérine/thréonine kinase atypique possédant un domaine kinase tronqué. L'analyse northern a démontré un transcrit de 3.61 kb exprimé dans les GC bovines. Une expression de très faible intensité a aussi été observée dans l'ovaire fœtal. L'analyse par northern virtuel a démontré que l'expression de l'ARNm de TRB2 était élevée dans les GC de DF et radicalement réduit par l'hCG dans les OF. De plus, l'analyse temporelle de son expression au cours de la période périovulatoire a permis de démontrer que cette réduction était rapide dans les OF et a été observée dès 6h suivant l'injection d'hCG. Les anticorps produits contre un fragment de TRB2 bovin ont démontré par immunobuvardage son expression dans les extraits protéiques totaux de GC de petits follicules (2-4 mm) et de DF alors que la protéine était absente dans les OF et le CL. L'expression de TRB2 dans les GC pourrait être cruciale pour le contrôle de la prolifération cellulaire lors de la croissance folliculaire.

Mots-clés : ADNc, expression différentielle, follicules, granulosa, TRB2.

## Introduction

La croissance cellulaire, incluant la prolifération et la différenciation, implique un grand nombre d'évènements qui agissent suivant des cascades dont certaines restent à être déterminées. Ces cascades font intervenir des protéines qui interagissent positivement ou négativement dans les mécanismes de transduction des signaux biologiques et les réponses cellulaires. La régulation de plusieurs réponses cellulaires dépend, entre autres, du contrôle des cascades des « *Mitogen Activated Protein Kinase* » (MAPK). Récemment, il a été démontré qu'un groupe de protéines nommées « *Tribbles homolog* » (TRB) contrôlaient l'activité des MAPK (Kiss-Toth et al., 2004). La famille des protéines TRB est composée de TRB1, TRB2 et TRB3 qui font partie de la superfamille des protéines sérine/thréonine kinases. Toutefois, leur domaine kinase est tronqué (Wilkin et al., 1997). Elles présentent des similarités à la protéine « *Tribbles* » initialement caractérisée chez la drosophile et dont on a mis en évidence son rôle crucial lors de la mitose (Mata et al., 2000; Seher & Leptin, 2000). Chez la drosophile, la protéine « *Tribbles* » se lie à la protéine « *String* », dont l'homologue chez les mammifères est la « *cell division cycle 25* » (*cdc25*), et entraîne l'ubiquitination de « *String* » et sa dégradation (Johnston, 2000; Mata et al., 2000; Seher & Leptin, 2000). Les informations disponibles sur TRB1 sont très limitées, cependant, TRB3 possède la capacité de rompre la signalisation de l'insuline en se liant directement à la protéine kinase B (PKB) ou Akt et bloque ainsi son activation (Du et al., 2003).

La protéine TRB2 a été caractérisée chez plusieurs espèces (Wilkin et al., 1997; Strausberg et al., 2002; Saka & Smith, 2004) mais aucune fonction précise ne

lui a été associée. L'orthologue canin de la TRB2, nommée *c5fw*, a été identifié à partir d'une génothèque d'ADNc de thyroïde de chiens traités au propylthiouracil et à la méthimazole (Wilkin et al., 1996, 1997). Ces composés chimiques ont pour effet d'augmenter le taux de la TSH circulante. Afin de caractériser les gènes différentiellement exprimés dans cette génothèque d'ADNc de thyroïde, celle-ci fut criblée à l'aide de sondes complexes d'ADNc radioactives générées à partir d'ARNm isolés de thyroïde traitées au propylthiouracil et à la méthimazole comparativement aux thyroïdes de chien non traités. On a conclu que la *c5fw* correspondait à une phosphoprotéine démontrant une courte demi-vie suggérant un contrôle rigoureux de son expression. Son induction a été démontrée dans les cellules des follicules thyroïdiens suite à l'activation des voies mitogéniques (Wilkin et al., 1997). Chez le rat, il a été observé que l'expression de TRB2 augmentait rapidement lors de l'apoptose des cellules neuronales (Mayumi-Matsuda et al., 1999).

Faisant suite au criblage différentiel de la génothèque soustraite d'ADNc DF-OF établie par l'approche de la SSH (voir chapitre 2), nous avons identifié un fragment correspondant à TRB2. L'hypothèse sous-tend que TRB2 serait différentiellement exprimé dans les cellules de la granulosa en période périovulatoire. L'objectif de ce travail a été de caractériser l'ADNc de TRB2 bovin, d'analyser son profil d'expression en ARNm dans divers tissus et au cours du développement folliculaire en période périovulatoire. L'expression de la protéine TRB2 a été comparée au cours du développement folliculaire grâce à la production d'un anticorps dirigé contre un fragment de la protéine TRB2 bovine.

## **Matériel et Méthodes**

### **Caractérisation de TRB2**

Un clone d'ADNc correspondant à celui de TRB2 a été identifié suite au repiquage aléatoire de clones issus d'une génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa de follicules dominants à J5 du cycle œstral et préparée dans les phages Lambda (Brûlé et al., 2000; Lussier et al., 2001). Ce dernier clone de TRB2 inséré dans le phagémide pBK-CMV a été caractérisé par séquençage tel que décrit au chapitre 2. La séquence d'acides aminés a été déduite de la séquence nucléotidique puis ses différentes caractéristiques (poids moléculaire, point isoélectrique, profil hydrophobique) ont été analysées à l'aide du progiciel « *Expasy Proteomic tools* » ([ca.expasy.org/tools](http://ca.expasy.org/tools)). Les motifs consensus ont été analysés à l'aide du progiciel « *InterProScan* » du « *European Bioinformatics Institute* » ([www.ebi.ac.uk/InterProScan/](http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/)) et les séquences d'acides aminés ont été alignées par la fonction « PHI- and PSI-BLAST » ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) de GenBank afin d'identifier les orthologues et paralogues de TRB2 disponibles dans les banques de données.

### **Analyse de l'expression de l'ARNm de TRB2**

L'expression du gène TRB2 a été étudiée par analyses northern et northern virtuel (Endege et al., 1999; Franz et al., 1999) tel que décrit au chapitre 2. Pour l'analyse northern, les ARN totaux ont été isolés à partir de divers tissus bovins récoltés à l'abattoir (Bédard et al., 2003). L'échantillon de cellules de la granulosa a été obtenu selon un protocole de suroovulation utilisant l'eCG chez la vache (Soumano

et al., 1998). Une ovariectomie a été réalisée trois jours suivant l'injection d'eCG et les cellules de la granulosa prélevées des follicules tel que décrit précédemment (Bédard et al., 2003). Les ARN totaux ont été séparés sur un gel d'agarose de 1 % renfermant 0.66 M de formaldéhyde puis transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond-N; Amersham Pharmacia Biotech) et fixés par un traitement aux UV (150 mJ) tel que décrit par Brûlé et al. (2000). La quantité d'ARN ribosomal (28S et 18S) a été estimée à la suite d'une coloration au bleu de méthylène. Une sonde de 619 pb localisée entre T<sup>2211</sup>-G<sup>2830</sup> de l'ADNc complet de TRB2 a été générée suite à l'incorporation de [ $\alpha$ P<sup>32</sup>]-dCTP (NEN, Life Sciences, Boston, MA) par amorces aléatoires (Amersham Pharmacia Biotech). Les étapes de préhybridation, d'hybridation et de lavages ont été réalisées telles que décrites précédemment (Brûlé et al., 2000). La membrane a été exposée à l'écran du phosphoimageur et analysée à l'aide de l'appareil *Storm* 840 (Amersham Pharmacia Biotech). L'analyse northern virtuel a été réalisée en utilisant des échantillons provenant de petits follicules (SF) récoltés à l'abattoir, de follicules dominants à J5 du cycle œstral (DF) provenant de vaches synchronisées, de follicules ovulatoires 23 h suivant l'injection d'hCG (OF) et de corps jaune à J5 du cycle œstral (CL) tel que décrit au chapitre 2. À partir de 1  $\mu$ g d'ARN total de chacun de ces échantillons, la technique « *SMART PCR cDNA synthesis* » (BD Biosciences Clontech) a été utilisée pour générer les ADNc correspondants. Ces ADNc ont été séparés sur un gel d'agarose, transférés sur membranes de nylon chargées (Hybond-N<sup>+</sup>; Amersham Pharmacia Biotech) et hybridés à l'aide de la sonde (619 pb) correspondant à TRB2.

De plus, l'analyse northern virtuel a permis d'étudier l'expression temporelle de TRB2 *in vivo* au cours de la période périovulatoire en utilisant le follicule dominant de la première vague folliculaire soit à J7 du cycle œstral et des follicules ovulatoires récoltés à divers temps suivant l'injection d'hCG selon le modèle préalablement caractérisé (Sirois, 1994). Le développement folliculaire de génisses Holstein âgées de 2 à 3 ans a été suivi par échographie transrectale telle que décrit à la rubrique « *Animal treatment* » du chapitre 2. La lutéolyse a été induite par l'injection d'une dose de 25 mg de PGF<sub>2</sub>α (25 mg, im; Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI) à 22 h au jour 7 du cycle œstral, suivie 36 h après, par l'injection d'une dose ovulante de 3000 UI d'hCG (3000 IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC). Les follicules ovulatoires ont été obtenus par colpotomie suivant l'injection d'hCG et furent disséqués de l'ovaire. Les parois folliculaires incluant les cellules de la thèque et de la granulosa ont été préparées selon le modèle précédemment décrit (Sirois, 1994). Les échantillons utilisés correspondaient aux follicules ovulatoires isolés aux temps 0 (n = 2), 6 (n = 2), 12 (n = 2), 18 (n = 2) et 24 h (n = 2) suivant l'injection d'hCG. Les échantillons de parois folliculaires isolés au temps 0 correspondaient aux follicules dominants à J7 du cycle œstral. Les concentrations en progestérone et en œstradiol-17β des liquides folliculaires ont été validés antérieurement (Filion et al., 2001). À partir de 1 µg d'ARN total de chacun de ces échantillons de paroi folliculaire, la technique « *SMART PCR cDNA synthesis* » (BD Biosciences Clontech) a été utilisée pour générer les ADNc correspondants. Ces ADNc ont été séparés sur un gel d'agarose, transférés sur membrane de nylon chargée (Hybond-N<sup>+</sup>; Amersham Pharmacia Biotech) et hybridés à l'aide de la sonde

(619 pb) correspondant à TRB2. Le gène GAPD a servi de contrôle lors des analyses par northern virtuel (tel que décrit au chapitre 2). Suite à l'hybridation et aux lavages, les membranes ont été exposées à l'écran du phosphoimageur puis analysées à l'aide de l'appareil *Storm-840*.

Le signal spécifique de TRB2 pour chaque échantillon a été normalisé par rapport au signal de GAPD correspondant. L'homogénéité de la variance entre les groupes de follicules et de CL a été vérifiée par les tests O'Brien & Brown-Forsythe (JMP, 1989). Les valeurs corrigées pour les niveaux d'ARNm de TRB2 ont été comparées entre les groupes de follicules ou de CL par l'analyse de variance « *One-way ANOVA* ». Les moyennes entre les groupes ont été comparées par l'analyse de comparaisons multiples « *Tukey-Kramer* » et considérées significatives à  $P < 0.05$ . Les données sont présentées sous forme de « *least-square means ± SEM* ».

### **Production des anticorps anti-TRB2 bovin**

Un fragment de la région C-terminale de la protéine TRB2 bovine correspondant à Arg<sup>154</sup>-Thr<sup>337</sup> ( $\Delta$ TRB2; Mr: 20.8 kDa) a été produite sous forme de protéine fusion ( $\Delta$ TRB2-GST) en utilisant la glutathione S-transférase (GST; Gene Fusion System, Amersham Pharmacia Biotech). La séquence d'acides nucléiques correspondant à cette portion de la protéine a été amplifiée par PCR à l'aide de la polymérase thermostable « *Expand High Fidelity* » (Roche Molecular Biochemicals) à l'aide d'oligonucléotides spécifiques (sens : 5'-AGGCTCTTCTACCAGATCGCC-3' et antisens : 5'-CTACAGTTGTACCTCCTCTGG-3') dont les sites de restriction BamH1 et EcoR1 ont été intégrés pour permettre le clonage directionnel. Le produit de PCR a été purifié et cloné dans le vecteur pGex-2T (Amersham Pharmacia Biotech)

tel que décrit précédemment (Bédard et al., 2003). Le plasmide recombinant a servi à transformer des bactéries *E. coli* de la souche BL21 (Amersham Pharmacia Biotech). Les bactéries ont été mises en culture à 37 °C dans le milieu de culture 2X YT en présence de 100 µg/ml d'ampicilline jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0.6 à 600 nm, puis la production de la protéine fusion  $\Delta$ TRB2-GST a été induite par l'ajout de 0.1 mM d'IPTG suivie d'une incubation à 37 °C pendant 5 h.

Les bactéries ont été centrifugées et soniquées pour générer les extraits de protéines totales (Bédard et al., 2003). Afin de vérifier la présence de la protéine fusion  $\Delta$ TRB2-GST, les protéines totales ont été séparées sur un gel dénaturant d'acrylamide SDS-PAGE de 12.5 %, suivi d'une coloration au bleu de coomassie. La protéine fusion  $\Delta$ TRB2-GST a été purifiée par affinité à l'aide de billes de glutathione Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) à partir des extraits totaux et digérée par la thrombine afin de libérer la protéine recombinante  $\Delta$ TRB2 de la GST. L'extrait digéré a été séparé sur un gel SDS-PAGE de 12.5% puis coloré au bleu de coomassie. La bande correspondant à la protéine  $\Delta$ TRB2 a été coupée et son identité vérifiée par spectrométrie de masse (« *liquid chromatography-tandem mass spectrometry* »; LC/MS/MS) au Centre Protéomique de l'Est du Québec (Université Laval, Québec, Canada). La protéine  $\Delta$ TRB2 a servi à immuniser un lapin selon le protocole déjà établi (Brûlé et al., 2000) afin de générer des anticorps spécifiques dirigés contre  $\Delta$ TRB2.

### Immunobuvardage

Les anticorps polyclonaux dirigés contre le fragment de la protéine TRB2 ont été validés par une analyse western en utilisant la protéine recombinante  $\Delta$ TRB2 et des extraits protéiques de petits follicules (SF), de follicules dominants à J5 du cycle œstral (DF), de follicules ovulatoires 23h suivant l'injection d'hCG (OF) et de corps jaune à J5 du cycle œstral (CL). Les extraits protéiques ont été générés tel que décrit au chapitre 4 (section : « *Cell extracts and immunoblotting analysis* ») et les concentrations protéiques déterminées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976; Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Lab, Mississauga, Ontario, Canada). Les protéines (100  $\mu$ g/échantillon) ont été séparées sur un gel dénaturant SDS-PAGE « *Novex Tris-Glycine gels* » de 18 % (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) puis transférées sur membrane de « *polyvinylidene difluoride* » (PVDF; Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). La détection immunologique a été réalisée telle que décrite précédemment (Brûlé et al., 2003). Les membranes ont été incubées avec l'anticorps anti- $\Delta$ TRB2 (1 : 2000) pendant 16 h à 4°C. Le complexe anticorps-protéine a été visualisé par une incubation de 2 h à l'aide d'un second anticorps anti-lapin couplé à la peroxidase (1 : 20 000; *Goat anti-rabbit IgG linked to horseradish peroxidase* [H&L chains; *human serum adsorbed*]; Life Technologies) suivi d'une révélation par chemiluminescence (ECL Plus; Amersham Pharmacia Biotech) selon le protocole du manufacturier.

## Résultats

### Caractérisation de TRB2 bovin

Un fragment d'ADNc correspondant à TRB2 fut caractérisé à la suite du criblage différentiel d'une génothèque soustraite d'ADNc de follicules dominants à J5 du cycle œstral auxquels les ADNc de follicules ovulatoires 23 h suivant une injection d'hCG ont été soustraits (DF-OF; chapitre 2). La caractérisation complète de son ADNc a été réalisée par séquençage suite au repiquage aléatoire d'un clone d'ADNc à partir d'une génothèque de cellules de la granulosa de follicules dominants à J5 du cycle œstral établie dans les phages Lambda. La séquence de l'ADNc de TRB2 bovin est de 3571 pb renfermant 497 pb dans la région 5'-UTR, un cadre de lecture ouvert de 1029 pb et une région 3'-UTR de 2045 pb incluant trois signaux de polyadénylation (Fig. 1). Le cadre de lecture ouvert code pour une protéine potentielle de 343 acides aminés ayant un poids moléculaire théorique de 38.7 kDa et un pI de 5.74. L'analyse des acides aminés dans GenBank par la fonction « BLAST » a révélé l'existence d'orthologues de la protéine TRB2 caractérisée, soit bovine (numéro d'accès GenBank : NP\_847887), canine (NP\_001003218), humaine (NP\_067675), murine (NP\_653134), de poule (NP\_989732) et de grenouille (BAC99103) présentant des identités de 99 % aux séquences bovine, canine et humaine, puis de 97 %, 96 % et 87 % aux séquences murine, de poule et de grenouille respectivement (Fig. 2). La comparaison des orthologues de TRB2 a révélé des caractéristiques de la superfamille des protéines kinases. TRB2 représente une protéine sérine/thréonine kinase atypique puisqu'elle possède un domaine kinase

tronqué ne renfermant que les sous-domaines VIII et IX des sérine / thréonine kinases complètes (Fig. 2). La comparaison des protéines TRB2 a révélé la présence de résidus d'acides aminés conservés dans les sous-domaines VIII et IX entre les différentes espèces étudiées. De plus, contrairement aux sérine/thréonine complètes, TRB2 ne possède pas de site de liaison à l'ATP. Toutefois, plusieurs motifs consensus représentant des sites de phosphorylation potentiels ont été détectés sur des résidus de sérine, thréonine et tyrosine. Le profil hydrophatique de TRB2 a révélé la présence d'une seule région hydrophobique potentiellement transmembranaire située entre les acides aminés Ser<sup>231</sup> et Val<sup>249</sup> (Fig. 2).

#### **Analyse de l'expression de l'ARNm de TRB2**

L'expression de TRB2 a été étudiée par analyse northern d'ARN totaux isolés de différents tissus bovins. De plus, les analyses par northern virtuel, utilisant des cellules de la granulosa ou de parois folliculaires isolés de follicules récupérés à différents stades de développement et de CL à J5 du cycle œstral, ont permis de comparer l'expression spatio-temporelle de TRB2. L'analyse northern a révélé la présence d'un seul transcrit de 3.61 kb qui a été observé principalement dans les cellules de la granulosa prélevées de follicules au troisième jour d'un traitement de suroovulation à l'eCG (Fig. 3). Une très faible expression était aussi visible dans les échantillons d'ovaire fœtal alors qu'aucune expression n'a été détectée dans les autres tissus analysés. Ces résultats démontrent un profil d'expression différentiel de l'ARNm de TRB2 selon les tissus. L'analyse northern virtuel a démontré la présence du transcrit dans les GC des SF et des DF à J5 du cycle œstral (Fig. 4). Par contre, cette expression fut indétectable dans les OF et dans le CL à J5 du cycle œstral (Fig.

4). L'expression de TRB2 fut réduite de 39 fois dans les GC des follicules induits à l'hCG comparativement aux DF à J5 ( $P < 0.0001$ ). De plus, l'analyse de l'expression temporelle de TRB2 a démontré son expression dans les parois du DF à J7 du cycle œstral précédent l'injection d'hCG suivie d'une réduction de sept fois 6 h suivant l'injection d'hCG ( $P < 0.0001$ ; Fig. 5A). Cette réduction fut maintenue à 12, 18 et 23 h post-hCG. Le même patron d'expression a été observé dans le modèle d'étude utilisant la relâche préovulatoire endogène de la LH. Les analyses ont démontré une forte expression de TRB2 dans le DF à J7 suivie d'une réduction de sept fois 24 h suivant la relâche préovulatoire de la LH (Fig. 5B).

#### **Analyse de l'expression de la protéine TRB2**

Les anticorps générés contre un fragment de la protéine TRB2 ont été validés par immunobuvardage. Les anticorps polyclonaux ont reconnu le fragment  $\Delta$ TRB2 produit par les bactéries et migrant à un poids moléculaire de 21.25 kDa, calculé suivant la migration électrophorétique sur un gel SDS-PAGE dénaturant (Fig. 6A). De plus, l'analyse a démontré que les anticorps ont reconnu la protéine TRB2 native migrant à un poids moléculaire de 38.5 kDa (fig. 6B). L'immunobuvardage démontre une forte expression dans les extraits de GC de SF et de DF à J5 du cycle œstral. Toutefois, cette expression est indétectable dans les extraits de GC de OF 23h suivant l'hCG et dans le CL (Fig. 6B).

## Discussion

La protéine TRB2 a été caractérisée chez plusieurs espèces mais son activité dans la reproduction chez les mammifères n'a pas encore été rapportée. L'expression différentielle de l'ARNm de *c5fw*, ou TRB2 canin, a néanmoins été démontrée dans la thyroïde de chien (Wilkin et al., 1996, 1997). Nos résultats sont les premiers à démontrer, chez l'espèce bovine, une expression différentielle de TRB2 dans les GC de DF comparativement aux OF. De plus, l'analyse temporelle en période périovulatoire a permis de préciser que l'arrêt de l'expression de ce gène se produisait tôt, soit 6 h, suivant la relâche préovulatoire de LH/hCG. Une forte expression du gène TRB2 dans les GC de SF et de DF en croissance a été observée tandis que dans les OF, l'expression de TRB2 était indétectable.

Les protéines *Tribbles* des mammifères sont regroupées dans une famille qui comprend, en plus de TRB2, deux autres membres à savoir TRB1 et TRB3. Peu d'informations sont disponibles sur TRB1. Cependant, les travaux sur TRB3 ont démontré sa capacité à rompre la signalisation de l'insuline en se liant directement à la protéine kinase B (PKB), aussi nommée Akt, bloquant ainsi son activité (Du et al., 2003). TRB3 se révèle donc comme un régulateur négatif de l'activité de la protéine sérine/thréonine kinase PKB/Akt jouant un rôle potentiel dans le diabète de type 2 (Koo et al., 2004). TRB3 se présente aussi comme un important participant dans la croissance des cellules tumorales et on a observé une augmentation de son expression dans des conditions de croissance hypoxique à long terme (Bowers et al., 2003). TRB3 est induite par le récepteur nucléaire « *Peroxisome Proliferator-activated*

*receptor alpha* » (PPAR- $\alpha$ ; Sher et al., 1993) et par le « *PPAR-gamma coactivator-1* » (PGC-1; Puigserver et al., 1998) durant le jeûne (Koo et al., 2004). Le facteur de transcription nucléaire PPAR- $\alpha$  et le coactivateur transcriptionnel PGC-1 sont fortement induits dans le foie de souris en situation de jeûne (Kersten et al., 1999; Yoon et al., 2000). Toutefois, aucune activité kinase n'a été reconnue à TRB3.

Les protéines de la famille des TRB ainsi que leurs orthologues présentent des caractéristiques de protéines sérine/thréonine kinases atypiques dont le domaine kinase est tronqué. Le domaine catalytique des protéines kinases eucaryotes se compose de 250 à 300 acides aminés et se subdivise en 12 sous-domaines qui sont pratiquement invariables (Hanks & Hunter, 1995). Le domaine catalytique présente trois fonctions (Hanks & Hunter, 1995). Une première fonction de liaison et d'orientation de l'adénosine triphosphate (ATP) ou de la guanosine triphosphate (GTP) est réalisée par la formation d'un complexe avec un cation bivalent représenté par  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . En général, cette fonction implique les sous-domaines I et VII du domaine catalytique. Le sous-domaine VII est caractérisé par sa capacité d'autophosphorylation (Steinberg et al., 1993). Une deuxième fonction de liaison et d'orientation du substrat (protéine ou peptide) est localisée au sous-domaine VI. Une troisième fonction, localisée au sous-domaine II, permet le transfert du phosphate en position  $\gamma$  de l'ATP ou du GTP sur le site accepteur du substrat. La protéine TRB2 ne possède pas de site de liaison à l'ATP. Ceci suggère que TRB2 pourrait constituer une partie de kinase dont la fonction nécessite un partenaire possédant les autres domaines en particulier un site de liaison à l'ATP tel que proposé chez l'espèce canine. Il ne semble pas y avoir d'activité kinase intrinsèque aux membres de cette

famille de protéines TRB. Des analyses réalisées sur TRB2 canin (Wilkin et al., 1997) n'ont mis en évidence aucune capacité de phosphorylation de substrat. De plus, ces analyses ont démontré que la demi-vie de la protéine était très courte (environ 1 heure) suggérant un contrôle rigoureux de sa présence dans la cellule. Par contre, il a été récemment observé que les TRB interviennent dans la voie MAP kinase et se présentent comme des inhibiteurs à des concentrations élevées (Kiss-Toth et al., 2004).

Les protéines TRB partagent avec la protéine « *Tribbles* » de la Drosophile leur domaine kinase tronqué. Chez la Drosophile, on a démontré que la protéine « *Tribbles* » inhibe la division mitotique en se liant à la protéine « *String* » (Mata et al., 2000) dont l'homologue chez les mammifères est la cdc25. « *Tribbles* » lie « *String* » chez la drosophile favorisant son ubiquitination, suivie de sa dégradation protéolytique (Johnston, 2000; Mata et al., 2000; Seher & Leptin, 2000). La protéine « *Tribbles* » de la Drosophile contrôle donc la progression du cycle cellulaire et les mouches n'exprimant pas TRB ont démontré une gastrulation défectueuse due à une activité élevée de « *String* » chez le zygote (Grosshans & Wieschaus, 2000; Mata et al., 2000; Seher & Leptin, 2000). La fonction de la protéine « *Tribbles* » chez la drosophile serait donc de ralentir la progression du cycle cellulaire en induisant la dégradation de la protéine « *String* » durant la gastrulation (Grosshans & Wieschaus, 2000; Mata et al., 2000). Durant l'ovogenèse, l'amplitude d'expression de « *Tribbles* » affecte le nombre de divisions des cellules germinales chez la drosophile (Mata et al., 2000). De plus, l'orthologue putative de « *Tribbles* » isolée chez la grenouille et nommée « *Xenopus TRB2* » (XTRB2; Saka & Smith, 2004) semble être associée au

fuseau mitotique durant la division cellulaire. Par ailleurs, des analyses informatiques ont révélé que TRB2 pourrait potentiellement lier des protéines dont les cyclines et le récepteur à l'activine.

Chez la vache, nous avons démontré que TRB2 était fortement réduit dans les OF comparativement aux DF. Il semble que l'expression de TRB2 soit nécessaire dans les cellules de la granulosa pour le développement des petits follicules et des DF. Bien que la fonction exacte de TRB2 ne soit pas définie, son domaine kinase tronqué, sa possibilité d'interaction avec d'autres protéines tel que démontré pour TRB3 et la capacité de « *Tribbles* » d'inhiber « *string* » chez la drosophile, suggère que TRB2 interviendrait dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Ces observations confèreraient à TRB2 des rôles potentiels dans l'inhibition de la division cellulaire mais le mécanisme d'action exact reste à déterminer.

### **Perspectives**

Suivant l'idée que TRB2 pourrait interagir avec d'autres protéines, il serait intéressant de rechercher d'éventuels partenaires de cette protéine en utilisant le système double-hybride de la levure, *Saccharomyces cerevisiae* (Fields & Song, 1989; Durfee et al., 1993 ). Cette technique a déjà été utilisée par plusieurs laboratoires (Chardin et al., 1993; Vojtek et al., 1993) et les interactions mises en évidence par ce système concernent des protéines de natures et de fonctions variées. Cette technique pourrait déterminer un ou plusieurs partenaires de la protéine TRB2 qui sont soit connues, soit présentant une similarité avec des familles de protéines connues, soit de nouvelles protéines. Pour les deux premières éventualités, les résultats permettraient de mieux cibler le rôle de TRB2 dans les processus de la

croissance folliculaire. Récemment, l'implication des membres de la famille des protéines TRB dans les voies MAP kinases a été démontrée (Kiss-Toth et al., 2004). Afin d'élucider le rôle fonctionnel de TRB2 dans les différentes cascades mitogéniques, il serait possible de bloquer l'entrée en phase S de cellules en culture tel que proposé par Wilkin et al. (1997). L'effet de la surexpression de TRB2 sur la prolifération cellulaire pourraient être étudiées dans les cellules de la granulosa de petits follicules mises en culture. Afin de vérifier l'état de prolifération des cellules, de la thymidine tritiée sera incorporée dans les noyaux des cellules en culture surexprimant TRB2. Par ailleurs, des souris transgéniques peuvent être produites chez lesquelles l'ADNc de TRB2 aura été intégré dans leur génome par microinjection. Un système dans lequel le gène TRB2 est invalidé chez des souris (souris « *knock out* ») pourrait également être généré. Ces deux expériences durant lesquelles le gène TRB2 est respectivement surexprimé et réprimé pourraient être très informatives sur la fonction de la protéine TRB2.

## Références

1. **Bédard J, Brûle S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG. (2003).** Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 64(2):152-165.
2. **Bowers AJ, Scully S, Boylan JF. (2003).** SKIP3, a novel *Drosophila* tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene*. 22(18):2823-1835.
3. **Bradford MM. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
4. **Brûle S, Faure R, Doré M, Silversides DW, Lussier JG. (2003).** Immunolocalization of vacuolar system-associated protein-60 (VASAP-60). *Histochem Cell Biol* 119(5):371-381.
5. **Brûlé S, Rabahi F, Faure R, Beckers JF, Silversides DW, Lussier JG. (2000).** Vacuolar system-associated protein-60: a protein characterized from bovine granulosa and luteal cells that is associated with intracellular vesicles and related to human 80K-H and murine beta-glucosidase II. *Biol Reprod* 62(3):642-654.
6. **Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, Bar-Sagi D. (1993).** Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260(5112):1338-1343.
7. **Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. (2003).** TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300(5625):1574-1577.
8. **Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ. (1993).** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7(4):555-569.
9. **Endege WO, Steinmann KE, Boardman LA, Thibodeau SN, Schlegel R. (1999).** Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 26(3):542-548.
10. **Fields S, Song O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-246.
11. **Filion F, Bouchard N, Goff AK, Lussier JG, Sirois J. (2001).** Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J Biol Chem* 276(36):34323-34330.
12. **Franz O, Bruchhaus I I, Roeder T. (1999).** Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res* 27(11):e3.
13. **Grosshans J, Wieschaus E. (2000).** A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 101(5):523-531.
14. **Hanks SK, Hunter T. (1995).** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9(8):576-596.

15. **JMP**. Software for statistical visualization on the Apple McIntosh. Version 2. SAS Institute Inc. Cary, NC; 1989
16. **Johnston LA. (2000)**. The trouble with tribbles. *Curr Biol* 10(13):R502-4.
17. **Kersten, S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. (1999)**. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest* 103: 1489–1498.
18. **Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill LA, Qwarnstrom EE, Dower SK. (2004)**. Human tribbles: A protein family controlling mitogen activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 279(41):42703-42708.
19. **Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, Montminy M. (2004)**. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 10(5):530-534.
20. **Lussier JG, Sirois J, Price C, Carrière P, Silversides DW (2001)**. Research in genomics applied at the undergraduate level: When research meets teaching objectives. In: Programm of the 34th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2001; Ottawa, ON. Abstract 71.
21. **Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rorth P. (2000)**. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* 101(5):511-522.
22. **Mayumi-Matsuda K, Kojima S, Suzuki H, Sakata T. (1999)**. Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 258(2):260-264.
23. **Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. (1998)**. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92(6):829-839.
24. **Saka Y, Smith JC. (2004)**. A *Xenopus* tribbles orthologue is required for the progression of mitosis and for development of the nervous system. *Dev Biol* 273(2):210-225.
25. **Seher TC, Leptin M. (2000)**. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 10(11):623-629.
26. **Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. (1993)**. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32(21):5598-5604.
27. **Sirois J. (1994)**. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135(3):841-848.
28. **Steinberg RA, Cauthron RD, Symcox MM, Shuntoh H. (1993)**. Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol Cell Biol* 13(4):2332-2341.
29. **Strausberg RL et al. (2002)**. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16899-16903.
30. **Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. (1993)**. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74(1):205-214.

31. **Wilkin F, Savonet V, Radulescu A, Petermans J, Dumont JE, Maenhaut C. (1996).** Identification and characterization of novel genes modulated in the thyroid of dogs treated with methimazole and propylthiouracil. *J Biol Chem* 271(45):28451-28457.
32. **Wilkin F, Suarez-Huerta N, Robaye B, Peetermans J, Libert F, Dumont JE, Maenhaut C. (1997).** Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *Eur J Biochem* 248(3):660-668.
33. **Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE, Spiegelman BM. (2000).** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol* 20(14):5343-5349.

**Figure 1. Séquences complètes de l'ADNc de TRB2 bovin et des acides aminés déduits.** L'ADNc codant pour TRB2 renferme 3571 pb et consiste en une région 5'-UTR de 497 pb, un cadre de lecture ouvert (ORF) de 1029 pb et une région 3'-UTR de 2045 pb incluant trois signaux de polyadénylation (AATAAA; soulignés) suivie de la queue polyA. Les acides aminés sont numérotés à partir de la première méthionine correspondant au codon initiateur de la traduction. La protéine déduite de la séquence d'acides nucléiques renferme 343 acides aminés pour un poids moléculaire théorique de 38.7 kDa et un pI de 5.74. Les astérisques représentent le codon stop.

-497 CCACGCGTCCGGTTTCTAACGCGCCGAGACCAAGCGGCGGCCGTGTGCGCTCCCCGAAGA  
 -437 CTGCACAAACTACAGCGAGGCTCCTCCGCCCGTCTGCTTCGGAAGCCTGCGTGGGGACT  
 -377 GCTTTGGGAGCCCCAGGGCTGCAGCTCCCCACCTTAGCAATCCGGTTACAAGTCCAGATC  
 -317 CACGTTGAAAAGGAGCGAGAGAGAGAAAACATAAAGTGC GAAGATTCTGCAAATCGCT  
 -257 GGGCGCTTTGGGGTAACAAAAGGACCCGAGTTGCCGCCGACCGAGGACCCCCGGGAGT  
 -197 CGGGCTCGGAGCAGACGAGGTGCCCGCGTCTCCCTTTTGGGGGGCTTCTAACTCTTCT  
 -137 CCACGTAGCCCCCTTCCCGTCCCTCCCTCTCGATCCCTTTTAACATCCGTGGCAGGGAG  
 -77 GCGCCTGCAGCCGACTCGCCCGGACTCATCTTTCAGCGGTTTTTTTTTTGTTTGTGCGA  
 -17 GTGCGATCCCCACACTCATGAACATACACAGGTCTACCCCCATCACAATAGCAAGATAT  
 1 MetAsnIleHisArgSerThrProIleThrIleAlaArgTyr  
  
 43 GGGAGATCGCGGAACAAAACCCAGGATTTTCGAGGAGTTGTCGTCTATAAGGTCCGCCGAA  
 15 GlyArgSerArgAsnLysThrGlnAspPheGluGluLeuSerSerIleArgSerAlaGlu  
  
 103 CCCAGCCAGAGTTTCAGCCCGAACCTCGGCTCCCCGAGCCCGCCTGAGACTCCGAACTTG  
 35 ProSerGlnSerPheSerProAsnLeuGlySerProSerProProGluThrProAsnLeu  
  
 163 TCGCATTGCGTTTCTTGCATTGGGAAATACTTATTGTTGGAACCCCTGGAGGGAGACCAC  
 55 SerHisCysValSerCysIleGlyLysTyrLeuLeuLeuGluProLeuGluGlyAspHis  
  
 223 GTTTTTCGGGCCGTGCATCTGCACAGTGGAGAGGAGCTGGTGTGCAAGGTGTTTGATATC  
 75 ValPheArgAlaValHisLeuHisSerGluGluGluLeuValCysLysValPheAspIle  
  
 283 AGCTGCTACCAGGAGTCCCTGGCCCCCTGCTTTTGCCTGTCTGCCACAGCAACATCAAC  
 95 SerCysTyrGlnGluSerLeuAlaProCysPheCysLeuSerAlaHisSerAsnIleAsn  
  
 343 CAAATCACCGAAATTATCCTGGGGGAGACCAAAGCCTATGTGTTCTTTGAGCGGAGCTAT  
 115 GlnIleThrGluIleIleLeuGlyGluThrLysAlaTyrValPhePheGluArgSerTyr  
  
 403 GGGGACATGCATTCCCTTCGTCCGCACCTGCAAGAAGCTGAGGGAGGAGGAGGCGGCCAGG  
 135 GlyAspMetHisSerPheValArgThrCysLysLysLeuArgGluGluGluAlaAlaArg  
  
 463 CTCTTCTACCAGATCGCCTCGGCCGTGGCCCACTGCCACGACGGGGGGCTGGTGCTCCGG  
 155 LeuPheTyrGlnIleAlaSerAlaValAlaHisCysHisAspGlyGlyLeuValLeuArg  
  
 523 GACCTCAAGCTTCGGAAATTCATCTTTAAGGACGAAGAAAGGACTCGGGTCAAGCTGGAA  
 175 AspLeuLysLeuArgLysPheIlePheLysAspGluGluArgThrArgValLysLeuGlu  
  
 583 AGCCTGGAAGACGCCTATATTCTGCGGGGAGATGACGATTCGCTCTCCGACAAGCACGGC  
 195 SerLeuGluAspAlaTyrIleLeuArgGlyAspAspAspSerLeuSerAspLysHisGly  
  
 643 TGCCCGGCGTATGTACAGCCAGAGATCTTGAACACCAATGGTAGCTACTCGGGCAAAGCA  
 215 CysProAlaTyrValSerProGluIleLeuAsnThrAsnGlySerTyrSerGlyLysAla  
  
 703 GCTGACGTGTGGAGCCTGGGAGTGATGCTCTACACCATGCTGGTTGGGCGGTACCCTFTC  
 235 AlaAspValTrpSerLeuGlyValMetLeuTyrThrMetLeuValGlyArgTyrProPhe  
  
 763 CATGACATTGAGCCCAGTTCCCTCTTTCAGCAAGATCCGGCGTGGCCAGTTCAACATTCCA  
 255 HisAspIleGluProSerSerLeuPheSerLysIleArgArgGlyGlnPheAsnIlePro  
  
 823 GAGACTCTGTGCCCCAAGCCAAGTGCCTCATCCGGAGCATCCTGCGGCGGGAGCCCTCG  
 275 GluThrLeuSerProLysAlaLysCysLeuIleArgSerIleLeuArgArgGluProSer

883 GAGCGGCTGACCTCCCAGGAGATTCTGGACCATCCTTGGTTTTCTACAGATTTTAGCGTC  
295 GluArgLeuThrSerGlnGluIleLeuAspHisProTrpPheSerThrAspPheSerVal

943 TCGAATTCAGGATATGGTGCTAAGGAAGTGTCTGATCAGCTGGTGCCAGATGTCAACATG  
315 SerAsnSerGlyTyrGlyAlaLysGluValSerAspGlnLeuValProAspValAsnMet

1003 GAGGAGACCTTGGACCCTTTCTTTAACTGAGCTCATGCCCCACGGGGACTTAGCAGGTAC  
335 GluGluThrleuAspProPhePheAsn\*\*\*

1063 CAGAAGCGAGAGAGAGGGGCAGCGGAGAGGAGTTCTTCCAGGGAACACGTATCGCCTGGCT  
1123 TGGTAGCAAGAGGGACACGGACTCACAGGCTTCTTGGTTCAAAGAAGGAAAACCGTCA  
1183 AGGAGCTGACTGACATGGGGCCAGAGACGCGGGATGGAGGCGGGCTCCAGGGTCTTGTC  
1243 GGGTGGGCAGGAGCCCCCTGGAGCTTCTCTCGCCGACGGAGCCCCCGGGAGACCACCC  
1303 CTGTGACTGGGCTGCTTCCGCCTATCCCCCTTCCATTTTGTTCCAAATAGTTGCAAAT  
1363 CTTGATAGAATCAAAACTCTGCCTCAAACACACATCTTGGCATCGCACTGTTAGCATTTA  
1423 ACTTCTTGTGCATGATTCAGGGAAGGTACCATTGGCCAGGGTTTTTTGTTTTAATTTTCT  
1483 TTTTAAACAAGCCAGCCACCTATCTGATAATTCCAATGGGGTTCATTAATAAATAATTCG  
1543 GTGCACAACAGACTGATGTGAAACCTGGGTGCTAAACTAAAAGAAATAAAAGTCCAGT  
1603 TTGTGTCTCCTAATTGCGCTCTTCAACTCATTTCTTCTAAATAAACTATTGAATATCCTG  
1663 GTCAGGAAATGACACGTTTAGTGCTTTGCTCCCTGAAGTGGGGGGAAAAAACAACCT  
1723 GTCCTTTAACCAGTATTCTGTTTTCTGTCAATTGGTTTGTGGCAGGAAGCTCTTAGAAG  
1783 TCAAACCTCCAGAAGCATCATTGCTATCATAGTTTAAAGAAAGAAAAATGAAAGGAAAAG  
1843 AGAAAGTCAACTCTTTAATTTTATTATTATTATTTTTTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
1903 GCTGGTGAATGACGAGGGCTGCATCACAGGCATGCCTGTTGCTGAGATGTTAGTGATGG  
1963 AGTGAGATTCCAGAATGCTGTTGGAGTCTGAAGCTCTTGTAACACTCTGATCTCAACTAA  
2023 ACATTTTGTCTTTGCTTTATTGGCAACTCATGAAATGAAGCAGGTTGTCCACATGTATG  
2083 AAATACAGGGCAGCTATTGCATTTTCTTTATAGAATATGAATCCTTGTTAGCTTGGGAGGC  
2143 CCTCTGGTTTTGGACAAAACCCCTCAGTTGAGACAGCAGGAAGGAAAATAAGCTGAAAGCT  
2203 AGGATGATATTAATAAACAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
2263 TGTATTTTTCAAGAACTCTTCTATTTATTAAGGAAAATGTCACATTTGTGATGTATTAAGC  
2323 CAGTACTTCAATTACGGGTAACTTGGGTAACATGTTACATGCTGTAGTTAACATTTATA  
2383 TATATATTTTTTTCTTTGTTTGGGTATTTCTGTCCCTGAAATAACCTTTTTATTTGGCTTT  
2443 TCTAGATAGCTTTATTTGATTTTCGAGTGGCAAATGTTTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTCTG  
2503 TTATGGCTTTTCTATATTGCTGTATGATACAGAACTCTTTCGGCATCAATATTTGTGTTT  
2563 CCAGTACCTCAGTTGTTCCGATTTTACTGCCTGTATATGTTTTTGTGAAATGGTCATGTTT  
2623 TTGGGTAGGTGACACGTGGACTCTAGTATGTAAATGTTACTTTGAATCTGTGCCTCATTTAT  
2683 AGTATGTGGCATGTATGTGCAGACCTTGGATGCTCTATTCCCTACTTAGCAAGAGCCCAGC  
2743 CTCATTCCTAGGAGGGCGGCTTAACCATTCATCGTCAGGAGACAAGGAGGCCATGGATTT  
2803 GCTCTGGATTCTATTTTGGTAACAGGAGATAAAAAAGGAGAGAGGGTTTTTTTACATTCG  
2863 AAGATGGGGCTGAGTAAAGAAGGACCTGTTTTTCTTCCCTCTCCCTTATTTTTTAAGTAC  
2923 CTTGTTGGAGGAAAGATTGGTGACATGCATGGTGGGAATCTATGGCCCTCTGGTGCCTTGT  
2983 CCTGTATTCGGTTAATGTTTTTGTCCCTAATCTCTTCAATCAATAAAATTTGTGCGTATTT  
3043 AACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Figure 2. Comparaison des acides aminés de la protéine TRB2 bovine à ses orthologues.** La séquence d'acides aminés a été alignée à la séquence bovine et celles disponibles dans GenBank (bovine: NP\_847887; canine: NP\_001003218; humaine: NP\_067675; murine: NP\_653134; de poule: NP\_989732 et de grenouille: BAC99103). La protéine TRB2 présente 99 % d'identité comparativement aux séquences bovine, canine et humaine, ainsi que 97 %, 96 %, et 86 % d'identité aux séquences murine, de poule et de grenouille respectivement. Les sous-domaines VIII et IX contribuant au domaine conservé de la superfamille des protéines kinases sont représentés dans les boîtes grises et les résidus hautement conservés dans ces sous-domaines sont indiqués en gras. Les résidus de sérine, thréonine et tyrosine représentant des sites potentiels de phosphorylation sont soulignés.

b: *Bos taurus*; c: *Canis familiaris*; h: *Homo sapiens*; m: *Mus musculus*; g: *Gallus gallus*; x: *Xenopus tropicalis*.

bTRB2	1	MNIHRSTPITIARYGRSRNKTQDFEELSSIRSAEPSQSFSFNLGSPSPPE
bTRB-2	1	.....
cC5FW	1	.....
hTRB-2	1	.....
mTRB-2	1	.....
gTRB-2	1	...Q...N...T...P...I...
xTRB-2	1	...Q...N...T...N...T...
bTRB2	51	TPNLSHCVSCIGKYLLLEPLEGDHVFRAVHLSGEELVCKVFDISCYQES
bTRB-2	51	.....
cC5FW	51	.....
hTRB-2	51	.....
mTRB-2	51	.....E.....
gTRB-2	51	.....G...L
xTRB-2	51	...S.....N...L...FL...G...T
bTRB2	101	LAPCFCLSAHSNINQITEIILGETKAYVFFERSYGDMSFVRTCKKREE
bTRB-2	101	.....
cC5FW	101	.....
hTRB-2	101	.....
mTRB-2	101	.....L.....
gTRB-2	101	.....P..K.....K..
xTRB-2	101	.....PI.H...A...I...H...K..
bTRB2	151	EAARLFYQIASAVAHCHDGGVLRLDLKLRKFIKDEERTRVKLESLEDAY
bTRB-2	151	.....
cC5FW	151	.....
hTRB-2	151	.....
mTRB-2	151	.....
gTRB-2	151	...K.....
xTRB-2	151	...V...X.V...X...V.N.X..K.....
bTRB2	201	ILRGDDDSLSDKHGCPAYVSP EILNTNGSYSGKAADVWSLGVMLYTMLVG
bTRB-2	201	.....
cC5FW	201	.....S.....
hTRB-2	201	.....S.....
mTRB-2	201	.....S.....V.....
gTRB-2	201	...N.....
xTRB-2	201	V.A.S.....
bTRB2	251	RYPFHDI EPSSLFSKIRRGQFNIPETLSPKAK-CLIRSILRREPSERLTSQ
bTRB-2	251	...Q.....-.....
cC5FW	251	.....-.....
hTRB-2	251	.....-.....
mTRB-2	251	.....-.....
gTRB-2	251	.....-.....
xTRB-2	251	.....K...QGQNV.YVAFF.....
bTRB2	301	EILDEPWFSTDFSVNSNGYGAKEVSDQLVPDVNMEETLDPFFN
bTRB-2	301	.....
cC5FW	301	.....N.....
hTRB-2	301	.....A.....N.....
mTRB-2	301	.....F...AC.....N.....
gTRB-2	301	.....N.....D.....
xTRB-2	302	.....NAL...C.....D.DT.....

Figure 2

**Figure 3. Analyse transcriptionnelle de l'ARNm de TRB2 par northern.** L'ARN total a été extrait de divers tissus bovins (20 µg/puits, excepté l'échantillon des cellules de la granulosa (10 µg/puits)) et analysé par northern tel que décrit dans la section matériels et méthodes. **A)** L'analyse northern démontre la présence d'un transcrit de 3.61 kb observé principalement dans les cellules de la granulosa de follicules prélevés au troisième jour d'un traitement de suroovulation. Une faible expression est aussi visible dans l'ovaire fœtal alors qu'elle est indétectable dans les autres tissus analysés. **B)** L'ARN 28S correspondant à chaque échantillon a été coloré au bleu de méthylène.

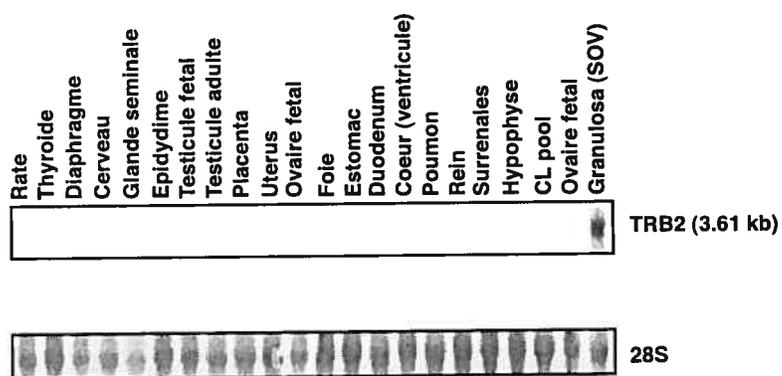
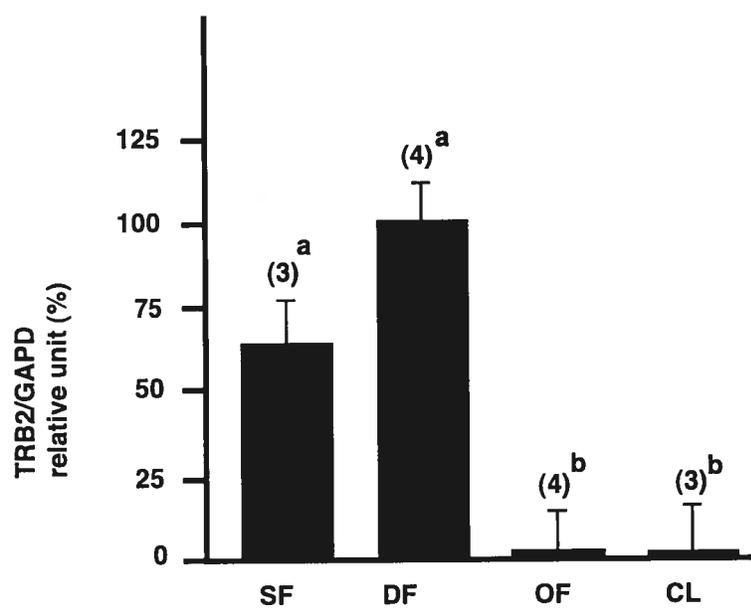
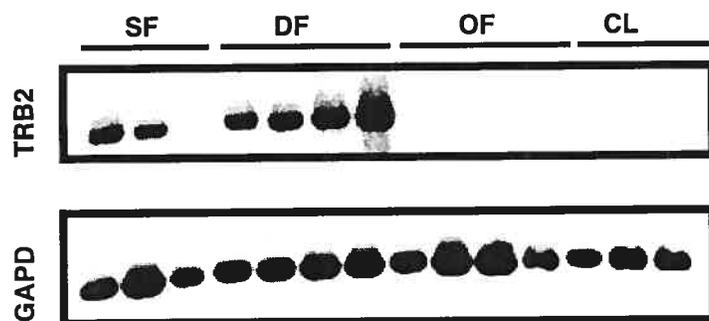
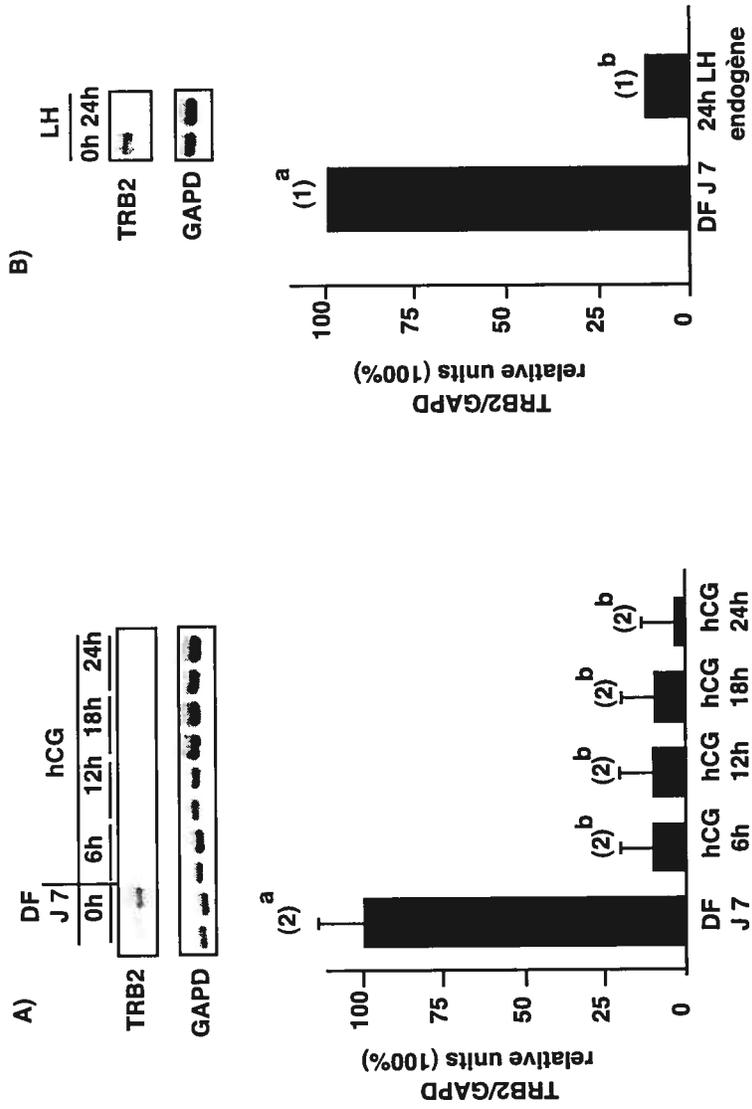


Figure 3

**Figure 4. Analyse de l'expression d'ARNm de TRB2 par northern virtuel.** Des ARN totaux ont été extraits à partir de cellules de la granulosa de petits follicules de 2-4 mm (SF), de follicules dominants à J5 du cycle œstral (DF), de follicules ovulatoires obtenus 23 h suivant une injection d'hCG (OF) et de corps jaune à J5 du cycle œstral (CL). Ces échantillons ont été utilisés pour des analyses de l'expression d'ARNm de TRB2 tel que décrit dans la section matériels et méthodes. L'expression de l'ARNm de GAPD a été utilisé comme gène contrôle et n'a pas démontré de différence significative entre les différents groupes. Le signal spécifique pour chaque groupe d'échantillon a été normalisé (%) en fonction de l'expression détectée dans le groupe de DF. L'expression de TRB2 était plus élevée dans les cellules de la granulosa des groupes SF et DF comparativement au groupe OF (ANOVA :  $P < 0.0001$ ). Les comparaisons multiples ont été réalisées par « *Tukey-Kramer* » ( $P < 0.05$ ). Les lettres différentes indiquent les moyennes qui diffèrent significativement. Les moyennes des groupes sont rapportées en « *least-square means*  $\pm$  SEM ».



**Figure 5. Analyse de l'expression temporelle de l'ARNm de TRB2 au cours de la période périovulatoire par northern virtuel.** **A)** Des ARN totaux ont été extraits à partir de parois folliculaires de follicules dominants à J7 du cycle œstral (DF) et de follicules ovulatoires (OF) à 6, 12, 18 et 24h suivant l'injection d'hCG. Ces échantillons ont été utilisés pour les analyses de l'expression de l'ARNm de TRB2 tel que décrit dans la section matériels et méthodes. L'expression de l'ARNm de GAPD a été utilisé comme gène contrôle et n'a pas démontré de différence significative entre les groupes. Le signal de chacun des échantillons a été corrigé à son signal GAPD correspondant et les valeurs ont été normalisées (%) en comparaison à l'expression mesurée dans le follicule dominant. L'expression de TRB2 est plus élevée dans le DF à J7 (ANOVA :  $P < 0.0001$ ). Une diminution significative est observée 6 h suivant l'injection d'hCG. Les lettres différentes dénotent une différence significative («*Tukey-Kramer*»;  $P < 0.05$ ). Les moyennes de groupes sont rapportées en «*least-square means*  $\pm$  SEM ». **B)** La comparaison des échantillons de parois folliculaires démontre une diminution de l'expression de TRB2 suivant la relâche préovulatoire endogène de la LH comparativement au DF à J7.



**Figure 6. Expression de la protéine TRB2 étudiée par immunobuvardage.** Le fragment  $\Delta$ TRB2 a été produit par les bactéries tel que décrit dans la section matériel et méthodes et a été utilisé pour générer des anticorps polyclonaux. La protéine recombinante  $\Delta$ TRB2 ainsi que des extraits protéiques (100  $\mu$ g) de cellules de la granulosa de petits follicules (SF), de follicules dominants à J5 du cycle œstral (DF), de follicules ovulatoires à 23 h suivant l'injection d'hCG (OF) et de corps jaune à J5 du cycle œstral (CL) ont été séparés sur un gel SDS-PAGE de 18 % puis transférés sur une membrane de PVDF et incubés avec l'anticorps anti-TRB2 (1 : 2000). Les anticorps reconnaissent la protéine recombinante  $\Delta$ TRB2 à 21.25 kDa (**A**) ainsi que la protéine native TRB2 à 38.5 kDa (**B**). La protéine TRB2 est présente dans les SF et plus intensément dans les DF alors qu'elle était absente dans les OF et le CL.

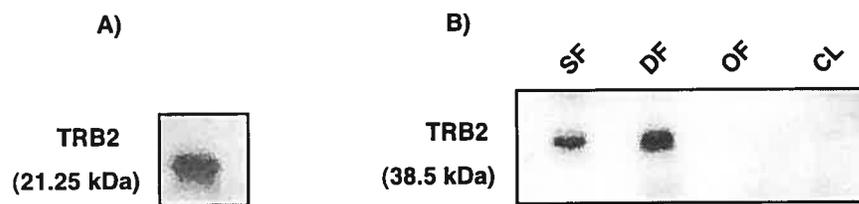


Figure 6

## CHAPITRE 4

**Molecular characterization of the lysosomal-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) reveals a differential expression pattern in granulosa cells of bovine dominant follicles**

Kalidou Ndiaye, Paul Carrière, Jean Sirois,

David W. Silversides and Jacques G. Lussier<sup>1</sup>

Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Tel: 450-773-8521 (ext. 8363); Fax: 450-778-8103; E-mail:



Running title: Structure and expression of LAPTM4B in granulosa cells

Key words: ovary, follicle, granulosa, gene expression, dominance, LAPTM4B

## Abstract

Follicular development results from an ordered spatio-temporal expression of multiple genes, many of which need to be identified. Characterization of full length cDNA by random sampling of specialized cDNA libraries is a valuable method for gene discovery. The objective was to characterize a new cDNA isolated from a phage cDNA library generated with bovine GC mRNA isolated from day 5 dominant follicles (DF). A cDNA was fully characterized and presented 1375 pb in length, which contains a 5'-UTR of 186 bp, an ORF of 678 bp and a 3'-UTR of 511 bp including one poly-A<sup>+</sup> signal followed by the poly-A<sup>+</sup> tail. The putative ORF codes for 226 amino acids corresponding to a protein of 25.4 kDa. Homology searches in GenBank revealed a recently characterized orthologous protein with an identity of 93% for the human protein and 90% for the mouse and rat proteins. These proteins were named lysosomal-associated transmembrane protein-4beta (LAPTM4B). Bioinformatic analyses of bovine LAPTM4B amino acids showed: no signal peptide, four putative transmembrane domains, potential sites for tyrosine phosphorylation, sulfatation, glycosylation, lipid interaction site, minimal SH3 ligand motifs and four tyrosine-based motifs in the C-terminus region. A single transcript of 1.8 kb was detected by Northern blot analysis, and showed variations in the steady state level of its mRNA between tissues. Comparison of mRNA expression in GC of different developmental stage follicles by virtual Northern showed increase expression from the small antral follicular stage (2-4 mm) compare to the DF and a reduction in ovulatory follicle (OF;  $P < 0.0001$ ). A specific polyclonal antibody was generated against a fragment of the LAPTM4B protein (Lys<sup>169</sup>-Ala<sup>225</sup>) that recognized by

immunoblotting a 26.3 kDa and a 31.5 kDa proteins. Level of the 26.3 kDa LAPT<sub>M4B</sub> protein in GC was highest in the DF and lowest in OF, and did parallel the variation observed for the mRNA levels. Expression of the 31.5 kDa protein was not different. Immunohistochemistry showed stronger labeling in GC of DF compared to OF. LAPT<sub>M4B</sub> was mainly immunolocalized in the perinuclear region and associated with vesicles suggesting a membrane localization in the endoplasmic reticulum and lysosomes. Heterogeneity of labeling was observed in epithelial cells lining the oviduct, uterus, seminal gland and epididymis. These results support the hypothesis that the LAPT<sub>M4B</sub> may be involved in cell proliferation that are required for follicular development.

## Introduction

Follicular development occurs on a continual fashion after birth by the constant recruitment from the pool of primordial follicles (Fortune et al., 2000) until small antral follicles stage, which corresponds to follicles of 3-4 mm of diameter in the cow (Lussier et al., 1987; Lussier et al., 1994). At the 3-4 mm stage, several follicles are recruited on a cyclic basis due to an increase in the concentration of circulating follicle-stimulating hormone (FSH; Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996). Following follicular recruitment, a single follicle is selected to become the dominant follicle whereas non-selected follicles undergo atresia (Markström et al., 2002). During follicular selection and dominance, granulosa cells (GC) acquire luteinizing hormone receptor (LHr) allowing the transfer of the follicle dependency from FSH to LH (Ginther et al., 2001; Webb et al., 2003). Nevertheless, mechanisms underlying selection and establishment of follicular dominance as well as ovulation needs to be better defined (Roche, 1996; Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2001; Zeleznik, 2001; Richards, 2002). Gene expression studies during follicular development and ovulation would thus contribute to improve our understanding of these physiological processes. Granulosa cells support reproductive functions by contributing to steroids hormone synthesis (Knight and Glistler, 2001), oocytes maturation (Eppig et al., 2002) and corpus luteum formation after ovulation (Rosenfeld et al., 2001). The characterization of full length cDNAs by the systematic or random sampling of a granulosa cell cDNA library is a valuable method for gene discovery as shown in other species (Wiemann et al., 2001; Strausberg et al., 2002; Imanishi et al., 2004; Ota et al., 2004). The objective of this study was to characterize

a new cDNA obtained from bovine GC isolated from day 5 dominant follicles (DF). We report the characterization of the bovine lysosomal-associated protein transmembrane-4 beta (bLAPTM4B). The bLAPTM4B shares a number of characteristics with other lysosome-associated proteins namely LAPTM4A and LAPTM5, which are thought to be involved in regulation of cell proliferation and cell survival (Hogue et al., 1996, 1997, 2002). Recently, the mRNA of LAPTM4B was shown to be expressed in human ovarian extract (Shao et al., 2003). Thus, we investigated the expression and the localization of the bLAPTM4B mRNA and protein in different tissues and during follicular development and ovulation in the bovine species.

## **Materials and Methods**

### **Cloning of bovine LAPTM4B**

The LAPTM4B cDNA was cloned from a bovine cDNA library prepared with polyA<sup>+</sup> mRNA isolated from granulosa cells collected from dominant follicles on day 5 of the estrous cycle as described below. The cDNA library was constructed in lambda Zap Express (Stratagene, La Jolla, CA) vector by unidirectional cloning of cDNAs (Brûlé et al., 2000). Following *in vivo* excision of pBluescript phagemids containing the cloned cDNA insert with the Ex-Assist/XLOLR system (Stratagene), single bacterial colonies were randomly picked and their phagemid content were purified by mini-prep (Qiagen, Mississauga, ON). The 5'-ends of their cDNA insert were analyzed by sequencing and sequences were compared by BLAST in GenBank at the National Center for Biotechnology Information

([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). A cDNA was randomly chosen on the basis that its sequence did not find a match in GenBank at the time of the analysis. The cDNA was entirely characterized by sequencing on an ABI Prism 310 (Applied BioSystem). The consensus nucleotide sequence of the LAPTM4B cDNA is reported and homology searches were done by BLAST. Amino acid sequences were deduced from the nucleotide sequences and analyzed for hydrophobicity and isoelectric point with the ExPASy Proteomic tools ([ca.expasy.org/tools](http://ca.expasy.org/tools)). Conserved amino acid patterns were analyzed using the software InterProScan from the European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk/InterProScan/](http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/)), and amino acid sequences were aligned by PHI-PSI BLAST software at ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

The 5'-end of the bovine LAPTM4B was verified by a three-step nested PCR approach performed on the phage granulosa cells cDNA library as previously described (Filion et al., 2001). Briefly, three sense primers specific for sequences located near the multiple cloning site of the pBluescript vector (S1: 5'-ACAGGAAACAGCTATGACCTTGATTACG-3', S2: 5'-CTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGG-3, S3: 5'-CCTGCAGGTCGACACTAGTGGATCC-3') and three antisense primers derived from the bovine LAPTM4B cDNA clone (AS1: 5'-GGCAGACACGTACGGGGGC-3, AS2: 5'-GGTAGGATTCAGTACTGACATGATATC-3', AS3: 5'-GGTGACCGCAACCAAGG-3') were used. Three round of PCR reactions were then performed. After electrophoresis on a 1% 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA-agarose gel, the DNA fragment was excised and ligated into pDrive vector (Qiagen PCR cloning kit) according to the manufacturer's protocol. DNA sequencing was

performed commercially. Furthermore, a genomic DNA library was screened to eventually yield all the 5'-UTR and promoter sequences. The genomic DNA library was prepared in bacteriophage Lambda vectors (BD Biosciences Clontech) and was screened using the complete LPTM4B cDNA (GenBank NM\_205802) as P<sup>32</sup>-radiolabelled probe. Hybridized clones were analyzed by PCR using specific probes designed in the 5'-UTR of the LPTM4B cDNA (sense: GCGAGCTCTTCGCGGGGAGAG; anti-sense: CAAGTACCAGACGCCGAGCAG) and a second round of screening was performed to isolate the positive clone. Recombinant DNA was purified as described (Sambrook & Russel, 2001) and ligated into pDrive plasmid vector (Quiagen Cloning kit) following BamH1 digestion. After PCR was performed using probes described above, plasmidic DNA was isolated from the positive clone and characterized by sequencing.

### **Experimental animal models**

The regulation of LPTM4B expression during follicular development and ovulation was studied using *in vivo* models as previously characterized (Ndiaye et al., submitted). Briefly, estrous cycles of normal cycling crossbred heifers were synchronized with one injection of PGF<sub>2α</sub> (25 mg, im; Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI) given in presence of a corpus luteum (CL) and ovarian follicular development was monitored by daily transrectal ultrasonography. Following estrus synchronization, heifers were randomly assigned to the dominant follicle group (DF), or the ovulatory hCG-induced follicle group (OF). In the DF group, the ovary bearing

obtained by ovariectomy (via colpotomy). The DF was defined as > 8 mm and growing while subordinate follicles were either static or regressing. The OF were obtained following an injection of 25 mg of PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse) on day 7 to induce luteolysis, thereby promoting the development of the DF of the first follicular wave into a preovulatory follicle. An ovulatory dose of hCG (3000 IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC) was injected 36 h after the induction of luteolysis, and the ovary bearing the hCG-induced OF was collected by ovariectomy between 22 to 23 h after hCG injection. Immediately following ovariectomy, follicular fluid and GC were collected separately from individual DF or OF as described previously, and stored at -70 °C (Ndiaye et al., submitted). Additionally, GC were collected from 2-4 mm small follicles (SF) obtained from slaughterhouse ovaries, and a total of three pools of 10-20 SF was prepared. Concentrations of progesterone (P<sub>4</sub>), estradiol-17β (E<sub>2</sub>) and their ratio (P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>) were validated by RIA of follicular fluid as previously described (Ndiaye et al., submitted). CL at day 5 of the estrous cycle were obtained by ovariectomy and were dissected from the ovarian stroma, frozen in liquid nitrogen, and then stored at -70 °C. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

### **mRNA expression analysis**

RNA was isolated from various bovine tissues obtained from slaughterhouse by extraction in lysis buffer (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% Na-N-laurylsarcosine, 25 mM Na-citrate, pH 7), sedimentation, and centrifugation on a

cesium chloride cushion as previously described (Bédard et al., 2003). The concentration of total RNA was quantified by measurement of optical density at 260 nm, and quality was evaluated by visualizing the 28S and 18S ribosomal bands following electrophoretic separation on 0.66 M formaldehyde denaturing 1% agarose gel with ethidium bromide (Sambrook & Russell, 2001). Expression of LAPTM4B mRNA in various tissues was compared by Northern analysis. Total RNA (20 µg/tissue) were size-fractionned on a 0.66 M formaldehyde, 1 % agarose gel, transferred by capillarity to a nylon membrane (Hybond-N; Amersham Pharmacia Biotech), and UV-treated (150 mJ) as previously described (Rabahi et al., 1999). The amount of ribosomal RNA (18S) was estimated after methylene blue staining and the image was digitized (FotoDyne Inc., Hartland, WI) and analyzed using the software NIH Image. The complete LAPTM4B cDNA (1,375 bp) was used to generate radioactive probes incorporating [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (NEN Life Sciences, Boston, MA) that were used to hybridize Northern blots as described (Bédard et al., 2003). The film images were digitized and the intensity of bands expressed as ratios of 18S ribosomal RNA.

Virtual Northern analysis was performed to compare LAPTM4B mRNA expression in GC collected from follicles at different developmental stages (SF, DF, OF) and CL as described above. For the follicular samples,  $E_2/P_4$  ratios were calculated for each sample: 1) 0.008, 0.06 and 0.01 for three SF pools (20 follicles per pool); 2) 17.3, 19.7, 14.3 and 63.4 for individual DF at day 5 ( $n = 4$ ); and 3) 0.44, 0.87, 0.64 and 0.27 ( $n = 4$ ) for individual OF (Ndiaye et al., submitted). Total RNA was extracted and quantified as described above. To perform virtual Northern blots,

SMART PCR cDNA synthesis technology (BD Biosciences Clontech) was used to generate cDNAs from 1 µg of total RNA isolated from GC and CL as previously described (Ndiaye et al., submitted). The complete LAPTM4B cDNA (1,375 bp) was used to generate radioactive probes incorporating [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPD) was used as a control gene. Probes were hybridized and washed under conditions previously described (Ndiaye et al., submitted). Membranes were exposed to a phosphor screen, and the images were digitized (Storm 840; Amersham Pharmacia Biotech).

#### **Production of an anti-bovine LAPTM4B antibody**

A fragment corresponding to amino acids Lys<sup>169</sup> to Ala<sup>225</sup> ( $\Delta$ LAPTM4B; Mr = 7.5 kDa) located at the carboxy-terminal end of the bovine LAPTM4B was used to generate a glutathione S-transferase fusion protein (GST Gene Fusion System, Amersham Pharmacia Biotech) to produce specific polyclonal antibodies. To increase the molecular weight of  $\Delta$ LAPTM4B recombinant protein fragment and thus facilitate down-stream purification procedures, a DNA construct that included a tandem repeat of  $\Delta$ LAPTM4B fragments cloned at the carboxy terminal end of GST was generated. A pair of sense (5'-AAGGGTACTTGATTAGCTGTGTTTGG-3') and antisense (5'-GGCAGACACGTACGGGGGC-3') primers that incorporated a *Bam*HI (sense primer) and an *Eco*RI (antisense primer) restriction sites were designed from the LAPTM4B cDNA to generate the first  $\Delta$ LAPTM4B fragment. The same pair of primers that incorporated an *Eco*RI (sense primer) and *Sal*I (antisense primer) were used to generate the second  $\Delta$ LAPTM4B fragment. The  $\Delta$ LAPTM4B fragments were amplified by PCR using the Expand High Fidelity polymerase (Roche

Molecular Biochemicals) following the manufacturer's protocol. The fragments were isolated after electrophoresis, digested with *Bam*HI and *Eco*RI, or *Eco*RI and *Sa*II for the first and second fragment, respectively. The first fragment was subcloned into pGEX-2T vector in frame with the GST coding region (Amersham Pharmacia Biotech), as described (Bédard et al., 2003). The second fragment was then subcloned down-stream of the GST- $\Delta$ LAPTM4B first fragment, and sequenced to confirm its integrity. Protease-deficient *E. coli* BL-21 (Amersham Pharmacia Biotech) were transformed with the  $\Delta$ LAPTM4B/pGEX-2T construct and expression of recombinant  $\Delta$ LAPTM4B/GST fusion protein was induced with isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside, and bacterial protein extracts were obtained after sonication (Brûlé et al., 2000). The  $\Delta$ LAPTM4B/GST fusion protein was purified by affinity on glutathione-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech), digested with thrombin to release the tandem  $\Delta$ LAPTM4B fragment, resolved by one-dimensional SDS-PAGE, stained with coomassie blue and transferred on nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m Hybond C; Amersham Pharmacia Biotech). The tandem  $\Delta$ LAPTM4B band ( $M_r = 15.3$  kDa) was cut and used to immunize rabbits as previously described (Brûlé et al., 2000). Preceding immunization, the identity of the purified  $\Delta$ LAPTM4B fragment was verified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Eastern Quebec Proteomics Center, Université Laval, Québec, Canada).

### **Cell extracts and immunoblotting analysis**

Granulosa cells and CL were obtained as described above. They were homogenized in M-PER buffer (Pierce, Rockford, IL, USA) supplemented with Complete protease inhibitors (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) as described

by the manufacturer's protocol, and centrifuged at 16,000 x g for 10 min at 4°C. The recovered supernatant was stored at -70 °C until electrophoretic analyses were performed. Protein concentration was determined by the method of Bradford (Bradford, 1976; Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Lab, Mississauga, ON, Canada). Immunoblotting was performed as described previously (Bédard et al., 2003). Samples (100 µg of proteins) were resolved by one-dimensional denaturing Novex Tris-glycine gels (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P; Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were incubated with the polyclonal anti-bovine LAPTM4B antibody (1:2000), and immunoreactive proteins were visualized by incubation with the horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit secondary antibody (1:20 000 dilution; Amersham Pharmacia Biotech) and the enhanced chemiluminescence system (ECL plus ; Amersham Pharmacia Biotech) following the manufacturer's protocol.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry was performed on PBS buffered formaline fixed follicles and CL that were generated as described above, and bovine tissues obtained from slaughterhouse. Paraffin-embedded tissues were cut at 8 µm thickness, mounted on SuperfrostPlus slides (Fischer Scientific, QC), deparaffined and rehydrated. Tissue sections were heat-treated as previously described (Brûlé et al., 2003), and were incubated for 14 h at 4°C with the anti-LAPTM4B serum at a dilution of 1:500 in Tris-buffered saline (TBS; 150 mM NaCl, 0.1 M Tris pH 7.5), 1% bovine serum albumin, and 1% fat-free skim milk. Control tissue sections were incubated similarly

with preimmune serum. Primary antibody-LAPTM4B complexes were detected by incubation with a monoclonal anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma Chemicals) at a dilution of 1:200 for 2 h at room temperature, followed by several washes in TBS, and incubation with the NBT/BCIP alkaline phosphatase substrate (Roche Diagnostics). Sections were mounted in 5% gelatin, 27% glycerol, and 0.1% sodium azide. Photographs were taken under bright field illumination using a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a digital camera (Nikon DXM 1200). Digital images were processed by the software Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) and assembled by the software Illustrator (Adobe Systems Inc.).

### **Statistical analysis**

For virtual Northern analysis, LAPTM4B signals were normalized with corresponding GAPD signals for each follicular or CL samples. Homogeneity of variance between follicular groups and CL was verified by O'Brien and Brown-Forsythe tests (JMP, 1989). Corrected values of gene specific mRNA levels were compared between follicular or CL groups by one-way ANOVA. When ANOVA indicated a significant difference ( $P < 0.05$ ), group means were compared by Tukey-Kramer multiple comparison tests. Data were presented as least-square means  $\pm$  SEM.

## Results

### Isolation and characterization of bovine LAPTM4B

The cDNA of bLAPTM4B was cloned from bovine GC of D5 dominant follicles and characterized by sequencing. The complete cDNA of bLAPTM4B is 1375 bp in length (Fig. 1) and was shown to include a 5'-untranslated region (UTR) composed of 186 bp, an open reading frame (ORF) of 678 bp and a 3'-UTR of 511 bp that includes a polyadenylation signal site followed by the poly-A<sup>+</sup> tail. The first methionine is flanked upstream by the Kozak's consensus sequence (-9(G), -6(C), -3(A/G); Kozak, 1986). The bLAPTM4B cDNA encodes a putative 25.4 kDa protein containing 226 amino acid residues with a pI of 4.75. Amino acid analysis indicated that bLAPTM4B presents four putative transmembrane domains located between amino acid residues, T<sup>25</sup>-A<sup>48</sup>, M<sup>72</sup>-Y<sup>94</sup>, I<sup>101</sup>-L<sup>123</sup>, and V<sup>155</sup>-W<sup>177</sup> respectively suggesting that the bLAPTM4B protein is likely a membrane protein (Fig. 2). The bLAPTM4B has two regions that serve as potential ligands for the SH3 domain characterized by the PXXP motifs. The amino acid sequence of bLAPTM4B presents at the C-terminus region four tyrosine-based motifs (YXX $\phi$ , where X is any residue and  $\phi$  is a large hydrophobic residue) and two valine-leucine (VL). These motifs can address signals targeting the proteins toward lysosomes or late endosomes (Tsifisoglou & Georgatsos, 1972; Hogue et al., 2002). Sequence comparison of bLAPTM4B in GenBank databases showed orthologous protein that was 93% identical to human LAPTM4B (accession numbers : CAB81951, Liu et al., 2000; CAB66876, Wiemanns et al., 2001; AAH14129, Strausberg et al., 2002; AAO84265, Shao et al., 2003), and 90% identical to mouse (AAK69596 and NP\_277056, Shao et

al., 2003) and rat species (XP\_235393). A potential phosphorylation site on tyrosine residue Y<sup>194</sup>, a potential sulfatation site on Y<sup>142</sup>, and two potential glycosylation sites on residue N<sup>187</sup> and N<sup>198</sup> were found. A lipocalin signature sequence (GXWYXX, where X is any amino acid residue and underlined residues are the conserved residues; Flower, 1996) was also identified at amino acids 22-34 (Fig. 2). This lipocalin signal are conserved between bovine, human and mouse sequences. Members of the lipocalin family are characterized by several common molecular-recognition properties including their ability to bind a range of small hydrophobic molecules (Flower, 1996).

#### **Expression analysis of bovine LAPT<sub>M</sub>4B mRNA**

The bLAPT<sub>M</sub>4B expression was analyzed at the mRNA level via Northern blot analysis using several bovine tissues (Fig. 3). A single transcript of bLAPT<sub>M</sub>4B was detected at 1.8 kb, and the intensity of the signal was highly variable between tissues. The bLAPT<sub>M</sub>4B steady state mRNA levels were highest in fetal ovary, testis, adrenal gland, liver and uterus, moderately expressed in other tissues, and the lowest level of expression was observed in the spleen (Fig. 3). Expression pattern of LAPT<sub>M</sub>4B during follicular development and ovulation was analyzed by virtual Northern using mRNA samples derived from GC at different follicular developmental stages and CL at D5 of the estrous cycle. The bLAPT<sub>M</sub>4B mRNA was differentially expressed with significantly highest expression in DF compared to SF, OF and CL ( $P < 0.0001$ ; Fig. 4). The bLAPT<sub>M</sub>4B mRNA level was increased by 4-fold in GC from SF to the DF stages, and declined by 3-fold in OF compared to DF.

### **Production of an anti-bovine LAPTM4B antibody and immunoblotting analysis**

The recombinant bovine  $\Delta$ LAPTM4B fragment corresponding to Lys<sup>169</sup> to Ala<sup>226</sup> with a theoretical Mr of 7.5 kDa was produced and released from GST by thrombin digestion. The tandem  $\Delta$ LAPTM4B peptide fragment that was generated, migrated at 15.3 kDa on a denaturing SDS-PAGE gel, and its amino acid content was sequenced by mass spectrometry that confirmed the identity of the tandem  $\Delta$ LAPTM4B. The tandem  $\Delta$ LAPTM4B was used as immunizing antigen.

Immunoblotting analyses showed that the polyclonal antibody against  $\Delta$ LAPTM4B recognized the affinity-purified and thrombin-cleaved tandem  $\Delta$ LAPTM4B fragment that migrated at a Mr of 15.3 kDa (Fig. 5A). The antibody recognized the native bLAPTM4B migrating at a Mr of 26.3 kDa in total protein extracts of GC and CL extracts, which corresponds to its theoretical Mr of 25.4 kDa (Fig. 5B). A higher Mr protein migrating at 31.5 kDa was also detected. Comparison of LAPTM4B 26.3 kDa protein content in GC and CL, showed the highest level in GC of DF and CL, whereas moderate level was observed in SF and lowest in OF (Fig. 5B). The cross-reacting protein band migrating at 31.5 kDa showed no variation between the different follicular stages and CL.

### **Immunolocalization of LAPTM4B**

Immunohistochemistry observations have provided evidence that LAPTM4B expression in bovine tissues is variable between tissues and showed specific pattern of expression even among similar cell type for a given tissue. In GC, a perinuclear pattern of immunostaining was observed in all cells (Fig. 6 A-F). Dominant follicles

obtained at D5 showed a labeling signal in GC that was stronger compared to GC from follicles obtained 23h following hCG (Fig. 6 B, E, F). In follicles of different sizes, theca cells were also stained but less compared to GC (Fig. 6 A-D).

Interestingly, GC and theca cells of small antral follicles that were adjacent to an hCG-treated ovulatory follicle showed a stronger staining compared to GC and theca cells of the OF (Fig. 6 C-E). Immunolabeling was variable between luteal cell type (Fig. 6 G, H). For instance, large luteal cells presented a weaker signal compared to small luteal cells. Moreover, subcellular labeling was associated with perinuclear vesicles (Fig. 6 H). Heterogeneity of staining for LAPT4B in the oviductal epithelial cells was noticeable, with weak to strong signals, and the localization was also variable being either at the baso-lateral or at the apical side (Fig. 6 I, J).

Epithelial and glandular endometrial cells immunostained for LAPT4B (Fig. 6 K-N). Interestingly, neither all epithelial nor glandular endometrial cells were labeled. Furthermore, endometrial glandular cells that were closer to the uterine lumen showed a stronger signal compare to the endometrial cells located deeper in the gland (Fig. 6 K). In testis, cells in the seminiferous tubules were labeled faintly, however, intensity of cell staining was variable between seminiferous tubules (Fig. 6 O, P). Epithelial cells lining epididymis tail ducts were strongly stained and the pattern of immunolabeling in these cells varied from intense to weak (Fig. 6 Q-S). Epithelial cells of the seminal gland, showed a variable expression pattern associated with a strong to weak signal even for adjacent group of cells (Fig. 6 T, U). Small cells dispersed in the adenohypophysis stained intensively whereas other adenohypophysis cells were negative for LAPT4B (Fig. 6 T-V). A strong labeling signal was detected in the neurohypophysis (Fig. 6 Y). Cells in cerebral and

cerebellar cortices immunostained for LAPTM4B (Fig. 6 Z-AB). In the granular layer of the cerebellum, some nervous cells were intensively stained, other smaller cells were either moderately stained or not, and Purkinje cells were negative for LAPTM4B (Fig. 6 AA, AB). No staining was observed in the molecular layer of the cerebellar cortex. In the liver, hepatocytes showed a labeling pattern located excentrically in the cell (Fig. 6 AC, AD). Also, heterogeneity in the staining signal varied between hepatocytes, being more intense in hepatocytes located near the centrolobular vein (Fig. 6 AC).

## Discussion

This study is the first to report the molecular characterization of the bovine LAPTM4B from a granulosa cells cDNA library. We have demonstrated that its expression is differentially regulated between tissues and during follicular development at the mRNA and protein levels. Following the comparison of its mRNA expression profile in different bovine tissues by Northern blot analysis, we hypothesized that bLAPTM4B mRNA expression in GC would vary in relation to follicular development. We have shown at the mRNA and protein levels that bLAPTM4B expression varies in GC according to the developmental stage of the follicle. Moreover, immunohistochemical observations have revealed that bLAPTM4B expression is highly variable between tissues and even in a similar cell type of a given tissue.

Characterization of the LAPTM gene family up to now consists to the LAPTM4A, LAPTM4B and LAPTM5, which are classified according to the number of transmembrane domains (Adra et al., 1996; Cabrita et al., 1999). The members of the LAPTM family and the cystinosins (Town et al., 1998) share similarities to lysosomal proteins since they are membrane proteins that contain multiple tyrosine residues. These tyrosine residues function as addressing signals targeting these proteins toward lysosomes or late endosomes (Tsifoglou & Georgatos, 1972; Marks et al., 1996; Gough et al., 1999; Cherqui et al., 2001; Hogue et al., 2002). It was shown that targeting membrane proteins toward the lysosomes require tyrosine or

dileucine signals (Hunziker & Geuze, 1996; Marks et al., 1996; Honing et al., 1998; Reaves et al., 1998; White et al., 1998). The carboxy-terminal end of the LAPTM4A and LAPTM4B proteins contains four motifs that include tyrosine residues and may potentially function as targeting signals. In the human and the mouse species, LAPTM4A protein are relatively abundant in the lysosomal membrane fraction (Hogue et al., 2002). In the mouse, LAPTM4A protein, also named « Mouse Transporter Protein » (MTP; Hogue et al., 1996) is functionally involved in the regulation of the distribution of multiple small molecules that are structurally distinct (Cabrita et al., 1999; Hogue et al., 1999).

The Northern and virtual Northern blot analyses have revealed a single transcript of 1.8 kb (with poly-A<sup>+</sup> tail) and 1.5 kb (without poly-A<sup>+</sup> tail), respectively, for the bLAPTM4B, which corresponds well to the length of the cDNA characterized. Interestingly, two transcripts of 2.2 kb and 1.5 kb were reported in the human species and were named LAPTM4B variant 1 and variant 2, respectively (Liu et al., 2003; Shao et al., 2003; Liu et al., 2004). The size of the human LAPTM4B variant 2 (GenBank accession number : AF527412; Shao et al., 2003) corresponds well to the bovine LAPTM4B cDNA characterized in this study. Recently in human, it was suggested that the 2.2 kb transcript contains two alternative initiating codons of translation that would yield two proteins of 35 kDa and 24 kDa (Liu et al., 2003; Shao et al., 2003; Liu et al., 2004). Western blot analyses using the anti-bLAPTM4B antibodies showed the presence of two bovine proteins migrating at 31.5 kDa and 26.3 kDa, which corroborates the molecular weight of the protein size observed in the human species (Liu et al., 2004). Meanwhile, the characterized cDNA sequence of

the bLAPTM4B contains only one initiation codon of translation. However, the sequences upstream of the ATG codon of the bovine cDNA characterized could be translated since it contains no stop codon. This suggests that we may have not characterized the full-length bLAPTM4B cDNA. Conversely, the size of the cDNA characterized corresponds to the size of the mRNA estimated by Northern blot (1.8 kb) and virtual Northern (1.5 kb). To verify if we had cloned the full-length bLAPTM4B cDNA, we have used a validated semi-nested PCR approach (Filion et al., 2001) on the GC cDNA library, to amplify a longer bovine 5'-UTR fragment. Unfortunately, this approach was not successful. To characterize the 5'-UTR region of bLAPTM4B, a genomic library was screened to eventually yield all the 5'-UTR and promoter sequences. The result showed that there was a single open reading frame coding for the 26.3 kDa form. It was suggested that following the synthesis of the 26.3 kDa protein, this form undergoes post-translational modifications like phosphorylation, sulfatation, glycosylation, lipid coupling thereby resulting in the 31.5 kDa protein. Multiple motifs for these potential modifications were found on LAPTM4B from bioinformatic analysis and may be functional.

Comparison of mRNA steady state levels in follicles of different developmental stages has shown that LAPTM4B was expressed in GC of SF, reached highest level in DF and declined in OF. Similarly, immunoblotting revealed a variable expression of the 26.3 kDa LAPTM4B protein with low level in SF, highest level in DF and lowest level in OF. These observations for the 26.3 kDa protein agree with observations generated at the mRNA level. Furthermore, the comparison of LAPTM4B expression by immunohistochemistry has provided further evidence that

LAPTM4B is expressed in GC of DF and reduced following hCG treatment in OF. However, no difference in the amount of the the 31.5 kDa protein was found. This could be explained by the accumulation of the 31.5 kDa following post-translational modifications as explained above, which confers a greater accumulation of the 31.5 kDa form. Thus, *de novo* synthesis of LAPTM4B protein is better reflected by the 26.3 kDa form and was paralleled to the variation in mRNA observed. However, this does not explain the results obtained in the CL, where mRNA level was low but the concentration of the 26.3 kDa protein was as high as the 31.5 kDa protein. This difference observed between the luteal and granulosa cells could be explained by a greater stability for LAPTM4B mRNA in the luteal cells. The observations made by immunolocalization have clearly shown that LAPTM4B is an intracellular protein being localized in the endoplasmic reticulum as shown by its perinuclear localization. Also, in cells that showed a low expression pattern of LAPTM4B like the large luteal cells, it was interesting to note that LAPTM4B immunolocalized in vesicles located perinuclearly. This observation correlates well with a lysosomal localization as previously observed for human LAPTM4A expressed in yeast (Hogue et al., 1996, 1997). In tissue like the ovarian follicle, granulosa and theca cells were labeled almost uniformly probably reflecting a synchrony in cell development necessary to insure the active development of the ovarian follicle, whereas in other tissues heterogeneity of labeling was observed for a similar cell type. This is particularly striking in tissues like the epithelial cells lining the oviduct, the uterus, the epididymis and the seminal gland. In these tissues, some epithelial cells do not stain whereas adjacent cells were strongly stained. This could reflect a different physiological status between these epithelial cells. Since no report on the immunolocalization of

LAPTM4B and LAPTM4A is available in any species, comparison of LAPTM4B expression between tissues and species will require future reassessment of this novel finding.

The observations made at the mRNA and protein levels indicate that LAPTM4B expression varies in GC of follicles at different stages of their development. LAPTM4B expression was higher in SF and DF while it was reduced in OF. These results suggest a potential role of LAPTM4B in the growth of ovarian follicles since the highest level of LAPTM4B expression at the mRNA and protein levels were observed in DF. It was suggested that human LAPTM4B promoted cell proliferation since it was over expressed in liver tumors (He et al., 2003). Also, it was proposed that LAPTM4A would be involved in cellular detoxification processes through transport of toxic substances in late endosomes and toward lysosomes when over expressed in yeast cells thereby participating to cell survival (Hogue et al., 1996, 1997). According to the shared characteristics between LAPTM4A and LAPTM4B and the presence of conserved domains between these two proteins, LAPTM4B could also be involved in cell proliferation by acting as a survival factor through its implication in the cellular detoxification mechanisms. Further investigations including immunolocalization at the cellular level of LAPTM4B and its effects on cell survival when over expressed as LAPTM4A would provide a better understanding to decipher LAPTM4B biological function and why its expression is increased in the DF.

## References

- Adra CN, Zhu S, Ko JL, Guillemot JC, Cuervo AM, Kobayashi H, Horiuchi T, Lelias JM, Rowley JD, Lim B. (1996).** LPTM5: a novel lysosomal-associated multispanning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells. *Genomics* 35(2): 328-337.
- Bédard J, Brûlé S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG. (2003).** Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 64(2):152-165.
- Brûlé S, Faure R, Doré M, Silversides DW, Lussier JG. (2003).** Immunolocalization of vacuolar system-associated protein-60 (VASAP-60). *Histochem Cell Biol* 119(5):371-381.
- Brûlé S, Rabahi F, Faure R, Beckers JF, Silversides DW, Lussier JG. (2000).** Vacuolar system-associated protein-60: a protein characterized from bovine granulosa and luteal cells that is associated with intracellular vesicles and related to human 80K-H and murine beta-glucosidase II. *Biol Reprod* 62(3):642-654.
- Cabrita MA, Hobman TC, Hogue DL, King KM, Cass CE. (1999).** Mouse transporter protein, a membrane protein that regulates cellular multidrug resistance, is localized to lysosomes. *Cancer Res* 59(19): 4890-4897.
- Cherqui S, Kalatzis V, Trugnan G, Antignac C. (2001).** The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem* 276(16): 13314-13321.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. (2002).** The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2890-2894.
- Filion F, Bouchard N, Goff AK, Lussier JG, Sirois J. (2001).** Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J Biol Chem* 276(36):34323-34330.
- Flower DR. (1996).** The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318 ( Pt 1):1-14.
- Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. (2000).** The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2):53-60.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. (2001).** Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod.* 65(3):648-654.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. (2001).** Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 65(3):638-647.
- Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R. (1996).** Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 55(1):68-74.
- Gough NR, Zweifel ME, Martinez-Augustin O, Aguilar RC, Bonifacino JS, Fambrough DM. (1999).** Utilization of the indirect lysosome targeting pathway by lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) is influenced largely by the C-

terminal residue of their GYXXphi targeting signals. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23):4257-4269.

**He J, Shao G, Zhou R. (2003).** Effects of the novel gene, LAPT<sub>M4B</sub>, highly expression in hepatocellular carcinoma on cell proliferation and tumorigenesis of NIH3T3 cells. *Beijing Da Xue Xue Bao* 35(4):348-352.

**Hogue DL, Ellison MJ, Vickers M, Cass CE. (1997).** Functional complementation of a membrane transport deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by recombinant ND4 fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 238(3):811-816.

**Hogue DL, Ellison MJ, Young JD, Cass CE. (1996).** Identification of a novel membrane transporter associated with intracellular membranes by phenotypic complementation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271(16): 9801-9808.

**Hogue DL, Kerby L, Ling V. (1999).** A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274(18): 12877-12882.

**Hogue DL, Nash C, Ling V, Hobman TC. (2002).** Lysosome-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPT<sub>M4</sub> alpha) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem J* 365(Pt 3): 721-730.

**Honing S, Sandoval IV, von Figura K. (1998).** A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* 17(5): 1304-1314.

**Hunziker W, Geuze HJ. (1996).** Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* 18(5):379-389.

**Imanishi T. et al. (2004).** Integrative Annotation of 21,037 Human Genes Validated by Full-Length cDNA Clones. *PLoS Biol* 2(6):E162.

**JMP.** Software for statistical visualization on the Apple McIntosh. Version 2. SAS Institute Inc. Cary, NC; 1989

**Kalidou Ndiaye, Tania Fayad, David W. Silversides, Jean Sirois and Jacques G. Lussier. (2004).** Identification of down-regulated mRNAs in bovine granulosa cells of dominant follicle following stimulation with human chorionic gonadotropin (hCG). Submitted November 2004

**Knight PG, Glister C. (2001).** Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121(4):503-512.

**Kozak M. (1986).** Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44(2):283-292.

**Liu J, Zhou R, Zhang N, Rui J, Jin C. (2000).** Biological function of a novel gene overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 113(10): 881-885.

**Liu X, Zhou R, Zhang Q, Zhang Y, Shao G, Jin Y, Zhang S, Lin M, Rui J, Ye D. (2003).** Identification and characterization of LAPT<sub>M4B</sub> encoded by a human hepatocellular carcinoma-associated novel gene. *Beijing Da Xue Xue Bao* 35(4):340-347.

**Liu XR, Zhou RL, Zhang QY, Zhang Y, Jin YY, Lin M, Rui JA, Ye DX. (2004).** Structure analysis and expressions of a novel tetratransmembrane protein, lysosoma-associated protein transmembrane 4 beta associated with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 10(11):1555-1559.

- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. (1987).** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 81(2):301-307.
- Lussier JG, Matton P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, Carruthers TD. (1994).** Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J Reprod Fertil* 102(1):95-105.
- Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino JS. (1996).** Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* 135(2): 341-354.
- Markstrom E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H. (2002).** Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123(1):23-30.
- Ota T et al. (2004).** Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36(1):40-5.
- Rabahi F, Brule S, Sirois J, Beckers JF, Silversides DW, Lussier JG. (1999).** High expression of bovine alpha glutathione S-transferase (GSTA1, GSTA2) subunits is mainly associated with steroidogenically active cells and regulated by gonadotropins in bovine ovarian follicles. *Endocrinology* 140(8):3507-3517.
- Reaves BJ, Banting G, Luzio JP. (1998).** Luminal and transmembrane domains play a role in sorting type I membrane proteins on endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 9(5): 1107-1122.
- Richards JS. (2002).** Delivery of the oocyte from the follicle to the oviduct: a time of vulnerability. *Ernst Schering Res Found Workshop* (41):43-62.
- Roche JF. (1996).** Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev Reprod* 1(1):19-27.
- Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. (2001).** Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 122(2):215-226.
- Sambrook J and Russell DW.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Shao GZ, Zhou RL, Zhang QY, Zhang Y, Liu JJ, Rui JA, Wei X, Ye DX. (2003).** Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22(32): 5060-5069.
- Strausberg RL. et al. (2002).** Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16899-16903.
- Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C. (1998).** A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18(4):319-324.
- Tsiftoglou AS, Georgatsos JG. (1972).** Metabolism of nucleosides by isolated mouse liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 262(3): 239-246.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. (2003).** Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 61:71-90.
- White S, Hatton SR, Siddiqui MA, Parker CD, Trowbridge IS, Collawn JF. (1998).** Analysis of the structural requirements for lysosomal membrane targeting using transferrin receptor chimeras. *J Biol Chem* 273(23): 14355-14362.

**Wiemann S, Weil B, Wellenreuther R, Gassenhuber J, Glassl S, Ansorge W, Bocher M, Blocker H, Bauersachs S, Blum H, Lauber J, Dusterhoft A, Beyer A, Kohrer K, Strack N, Mewes HW, Ottenwalder B, Obermaier B, Tampe J, Heubner D, Wambutt R, Korn B, Klein M, Poustka A. (2001).** Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Res* 11(3):422-435.

**Zeleznik AJ. (2001).** Follicle selection in primates: "many are called but few are chosen". *Biol Reprod* 65(3):655-659.

**Figure. 1. Nucleotide and amino acid sequences of the bovine LAPTM4B.** The bLAPTM4B was cloned from a granulosa cell cDNA library and the amino acid sequence was deduced from the cDNA (GenBank accession number : NM\_205802). Nucleotides and amino acids are numbered at the left. The bLAPTM4B cDNA is composed of 1375 nucleotides, comprising 186 bp in the 5'-untranslated region (UTR), an open reading frame (ORF) of 678 bp, and 511 bp in the 3'-UTR followed by a poly (A)<sup>+</sup> tail (not represented). The ORF encodes for 226 amino acids representing a protein of 25.4 kDa in molecular weight. The amino acid numbering begins at the first methionine of the ORF and the stop codon is represented by asterisks. The single polyadenylation site is underlined.

-186 GCGAGCTCTTCGCGGGGAGAGGCGAGGGGCCCGGGGCCAGTGGTAGGCGGACGGGGGCCG  
-126 GGAAGAGGGGAGCGAGGGTAGCCGGGGAGAGAGGGGCCGGCGACAGCCGCGCGGCGCTCAG  
-66 GACCGACGGCCAAAGCTCCTGCGAACTTGGGGCGCAGAGTCGCGCCACTGCGCCCCGGGCC  
-6 CGAGCGATGAAGATGGTGGCCCCCTGGACGCGGTTCTACTCCAACAGCTGCTGCCTCTGC  
1 MetLysMetValAlaProTrpThrArgPheTyrSerAsnSerCysCysLeuCys  
  
55 TGCCATGTCCGCACTGGCACCATCCTGCTCGGCGTCTGGTACTTGATCCTCAATGCCGTG  
19 CysHisValArgThrGlyThrIleLeuLeuGlyValTrpTyrLeuIleLeuAsnAlaVal  
  
115 GTACTGCTGATTCTGTTGAGTGCCCTGGCTGATCCAGATCATTACCACTTTTCAAGTTCT  
39 ValLeuLeuIleLeuLeuSerAlaLeuAlaAspProAspHisTyrHisPheSerSerSer  
  
175 GAACTCGGGGGTGACTTTGAGTTCATGGATGATGCCAACATGTGCATTGCCATCGCGATT  
59 GluLeuGlyGlyAspPheGluPheMetAspAspAlaAsnMetCysIleAlaIleAlaIle  
  
235 TCTGTTCTCATGATCCTTATCTGTGCCATGGCTACGTACGGCGCATACAAGCAACGCGCA  
79 SerValLeuMetIleLeuIleCysAlaMetAlaThrTyrGlyAlaTyrLysGlnArgAla  
  
295 GCCTGGATCATCCCATTCTTCTGCTACCAGATCTTTGATTTTGCCCTCAACACCTTGTT  
99 AlaTrpIleIleProPhePheCysTyrGlnIlePheAspPheAlaLeuAsnThrLeuVal  
  
355 GCGGTCACCGTACTTGTATTATCCAAACTCCATCCAGGAATACATACGACAGCTGCCTCCT  
119 AlaValThrValLeuValTyrProAsnSerIleGlnGluTyrIleArgGlnLeuProPro  
  
415 GATTTTCCTTACAAAGATGATATCATGTCAGTGAATCCTACCTGTTTGGTCCTCATTATT  
139 AspPheProTyrLysAspAspIleMetSerValAsnProThrCysLeuValLeuIleIle  
  
475 CTTCTGTTCATCAGCATTATCTTGGCTTTTAAGGGTACTTGGATTAGCTGTGTTTGGAA  
159 LeuLeuPheIleSerIleIleLeuAlaPheLysGlyTyrLeuIleSerCysValTrpAsn  
  
535 TGCTACCGATATATCAATGGCAGGAACCTCTGATGTCCTGGTTTATGTTACCAGCAAC  
179 CysTyrArgTyrIleAsnGlyArgAsnSerSerAspValLeuValTyrValThrSerAsn  
  
595 GACTCTACGGTGCTGCTACCCCGTACGATGATGCCACTGTGAACAGCGCCACCAAGGAG  
199 AspSerThrValLeuLeuProProTyrAspAspAlaThrValAsnSerAlaThrLysGlu  
  
655 CCGCCGCCCCGTACGTGTCTGCCTGAGCCTGGAAGTTGGGCAGCATGAGAGCAACAGCC  
219 ProProProProTyrValSerAla\*\*\*  
  
715 AGACTTGTCATTCATCAGAGCAATAGTTCTTTAATTTTTCTTCTGAGATGAGCTCTCTGA  
775 GCTTATTTGTTGCAGAAATGCTACAGTTTAAAATTTTAGATGTTAAGTTGAAGCTCTGTA  
835 GTTTGAAACCTATGCTTTAGCTGGAGCACCTTGCTAGAGTAGCTGTAGAAATTCCTCGG  
895 TGGGGTGGGGTGGGGTGGGCTCCCTAGTTTTCCCTCGGCGTTGGAACACCCAACAACC  
955 CGGATGAATCTCGAGTCCGAGACGTCTGTTGTACGTGCTGAGCCCCAGAGTCGAAGACTT  
1015 TCCAACGCTTTTCTTCACTCCCTCTTTCTTTTGAACGTGTATAATCAAGTCAAAAT  
1075 TAGACAGTGCTTTCTTGGCCATTCCAATTTATAGAAGAAACCCCTTAGGAGAACAGGAAT  
1135 GTTATTTGTGTAAGGAGTCCATATAAATACATAAAATAAACAAGAATTTCTTGTAG

**Figure 2. Comparison of the bLAPTM4B amino acid sequence to other related LAPTM4B.** The deduced amino acid sequence of the bLAPTM4B was aligned to the human, mouse and rat LAPTM4B. Dots represent identical amino acid residues and spaces (-) were introduced to allow maximum matching. The bLAPTM4 is 93 % identical to human LAPTM4B (accession numbers: AAH14129; AAH31021; AAO84265; AAL14034; CAB66876), and 90 % to mouse LAPTM4B (AAH19120; NP\_277056) and rat LAPTM4B (XP\_235393). The four hydrophobic transmembrane regions are indicated in gray. The lipocalin signature sequence is represented by the amino acid residues from T<sup>22</sup> to N<sup>34</sup> (in bold) and the conserved residues in this motif are underlined. The PXXP motifs, potential ligands to SH3 domains are underlined. There are four tyrosine-based motifs in the C-terminus at Y<sup>180</sup>, Y<sup>194</sup>, Y<sup>207</sup>, and Y<sup>223</sup> (in bold). The residue Y<sup>194</sup> also represents a potential phosphorylation site. A potential sulfatation motif was found on tyrosine Y<sup>142</sup> and potential glycosylation sites were found on N<sup>187</sup> and N<sup>195</sup> and are indicated by stars. Amino acids are numbered at the left.

```

bLAPTM4B 1 MKMVAPWTRFYNSNCCCLCHVRTGTILLGVWYLILNAVLLILLSALADP
hLAPTM4B 1 .....I.....
mLAPTM4B 1 .....H.....I.....
rLAPTM4B 1 .....H.....I.....I.....
hLAPTM4B 92 .....I.....
hLAPTM4B 145 .....I.....

bLAPTM4B 51 DHYHFSSELGGDFEFMDDANMCIAIAISVLMILICAMATYGAYKQRAAW
hLAPTM4B 51 .Q.N.....L.....
mLAPTM4B 51 NQ...G.....E.....L.....H...
rLAPTM4B 51 .Q.H..G.....E.....L. ....H..
hLAPTM4B 142 .Q.N.....L.....
hLAPTM4B 195 .Q.N.....L.....

bLAPTM4B 101 IIPFFCYQIFDFALNTLVAVTVLVYPNSIQEYIRQLPPDFPYKDDIMSVN
hLAPTM4B 101 .....M...I...I.....N...R..V...
mLAPTM4B 101 .....I.....S...R.....
rLAPTM4B 101 .....I.....S...R.....
hLAPTM4B 192 .....M...I...I.....N...R..V...
hLAPTM4B 245 .....M...I...I.....N...R..V...

bLAPTM4B 151 PTCLVLIILLFISIIILAFKGYLISCVWNCYRYINGRNSSDVLVYVTSNDS
hLAPTM4B 151 .....T.....
mLAPTM4B 151 .....G.L.TL.....S.....T
rLAPTM4B 151 .....V.....G...T.....S.....T
hLAPTM4B 242 .....T.....T.....
hLAPTM4B 295 .....T.....T.....

bLAPTM4B 201 TVLLPPYDDAT-VNSATKEPPPPYVSA
hLAPTM4B 201 .....-..G.A.....
mLAPTM4B 201 .....A.P.TA.....
rLAPTM4B 201 T(incomplete)
hLAPTM4B 292 .....-..G.A.....
hLAPTM4B 345 .....-..G.A.....

```

Figure 2

**Figure 3. Analysis of bLAPTM4B mRNA expression in bovine tissues by Northern blot.** Total RNA was extracted from various bovine tissues and samples (20  $\mu$ g/well) were analyzed by Northern blot as described under Materials and Methods. A) Northern blot analysis detected the presence of a single 1.8 kb transcript corresponding to bLAPTM4B and showed a variable pattern of expression between tissues. B) Ribosomal RNA (18S) corresponding to each sample was stained with methylene blue. C) Comparison of relative steady state levels of bLAPTM4B mRNA expression corrected by the amount of 18S rRNA.

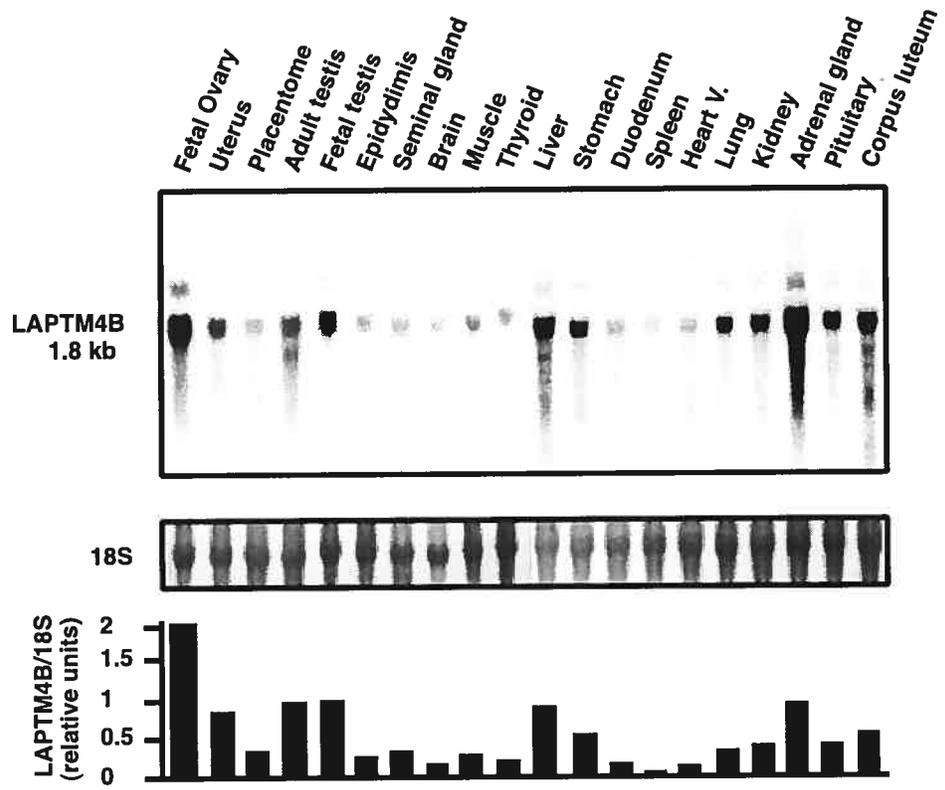


Figure 3

**Figure 4. Analysis of bLAPTM4B mRNA expression during follicular development by virtual Northern blot.** Total RNA was extracted from bovine GC of 2-4 mm follicles (SF), dominant follicles at Day 5 of the estrous cycle (DF), ovulatory follicles 23 h after injection of hCG (OF), and CL from Day 5 of the estrous cycle, and was analyzed using virtual Northern blot as described under Materials and Methods. GAPD was used as a control gene, and showed no significant difference in mRNA expression levels between samples. Gene-specific signals were normalized with corresponding GAPD signals for each sample. Expression of LAPTM4B displayed a 4-fold and 3-fold higher expression level in DF than in SF and in OF, respectively (ANOVA:  $P < 0.0001$ ). Different letters denote samples that are significantly different ( $P < 0.05$ ) when Tukey-Kramer multiple comparison test was performed. Data are presented as least-square means  $\pm$  SEM, and the number of independent samples per group is indicated in parenthesis.

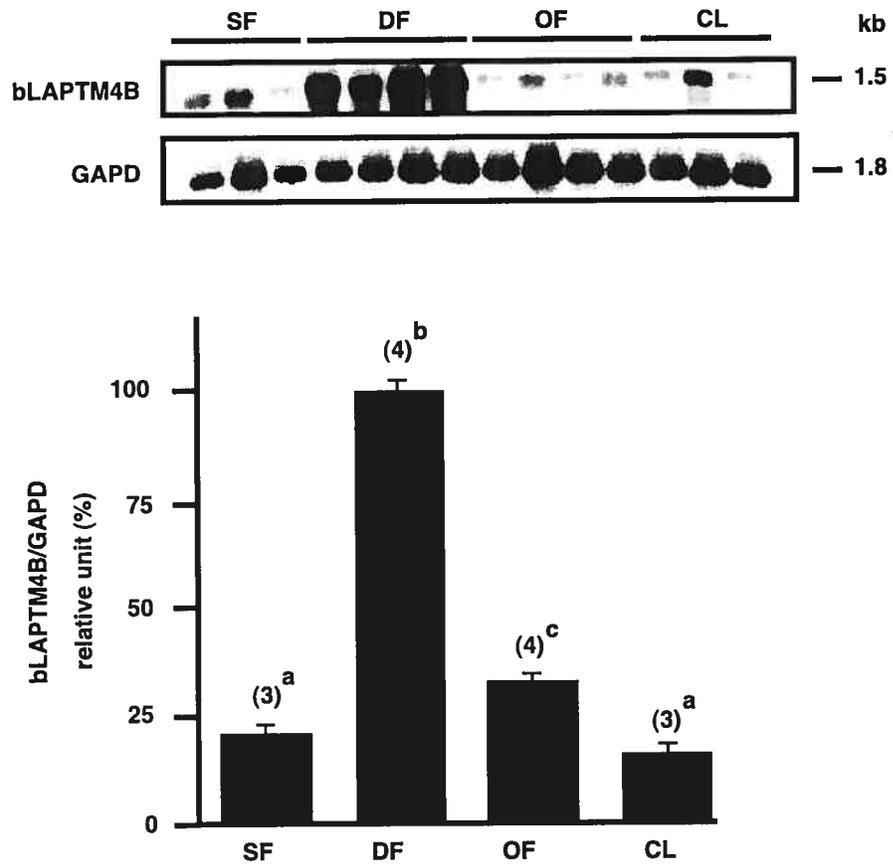


Figure 4

**Figure 5. Comparison of bLAPTM4B protein expression.** Total proteins extracts (100  $\mu$ g/well) from 2-4 mm small follicles (SF), dominant follicles at Day 5 of the estrous cycle (DF), ovulatory follicles 23 h after hCG injection (OF) and CL at Day 5 and the recombinant fragment  $\Delta$ bLAPTM4B were size-fractionned on a 18 % denaturing SDS-PAGE gel and immunoblotted using a specific polyclonal antibody raised against a fragment of the bLAPTM4B as described under Materials and Methods. A) The recombinant tandem fragment  $\Delta$ bLAPTM4B was specifically recognized at 15.3 kDa. B) The native bLAPTM4B showed two forms migrating at 26.3 kDa and at 31.5 kDa. Highest level of the 26.3 kDa protein was observed in DF and CL, and lowest level in OF. Level of the 31.5 kDa form was not different between samples.

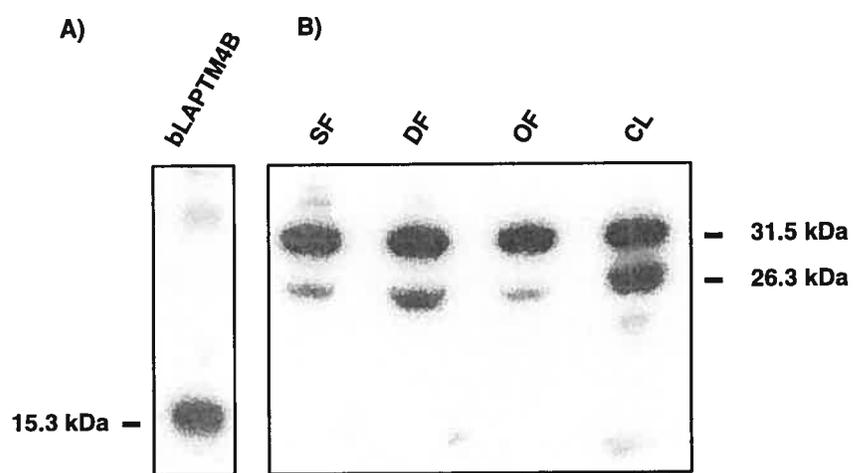


Figure 5

**Figure 6. Immunohistochemical localization of LAPTM4B in bovine tissues.**

Paraffin-embedded tissues were incubated with the antibody directed against the recombinant  $\Delta$ LAPTM4B (1: 500 dilution). The complex was detected with a monoclonal anti-rabbit antibody coupled to alkaline phosphatase and NBT/BCIP as substrate. *Bar* 0.1 mm if not otherwise stated. **A.** Follicular walls of two 4-5 mm adjacent follicles from day 2-3 of the estrous cycle. *A* antrum, *G* granulosa, *S* stroma, *T* theca. **B.** Follicular wall of a day 5 dominant follicle. **C.** Follicular wall of an ovulatory follicle 23 h following hCG-injection beside a 0.5 mm antral follicle. **D.** Higher magnification of the follicular wall from the 0.5 mm antral follicle presented in C. **E.** Higher magnification of the follicular wall from the ovulatory follicle presented in C. **F.** Follicular wall of an ovulatory follicle 23 h following hCG-injection. **G.** Corpus luteum at day 10 of the estrous cycle. *LC* large luteal cells, *SC* small luteal cells. **H.** Higher magnification of the corpus luteum section presented in G. *LC* large luteal cells, *SC* small luteal cells, *V* perinuclear vesicles. *Bar* 0.05 mm. **I.** Oviduct. *OE* Oviductal epithelial cells, *L* lumen, *S* stroma. **J.** Higher magnification of oviduct in I. *OE* Oviductal epithelial cells, *S* stroma, *L* lumen. **K.** Endometrium. *EE* endometrial epithelial cells, *EG* endometrial glandular cells, *L* lumen, *S* stroma. **L.** Higher magnification of endometrium presented in K. *EE* endometrial epithelial cells, *EG* endometrial glandular cells, *L* lumen, *S* stroma. **M.** Higher magnification of endometrium presented in L. *EE* endometrial epithelial cells. *L* lumen, *S* stroma. *Bar* 0.05 mm. **N.** Higher magnification of endometrium presented in K. *EG* endometrial glandular cells, *L* lumen, *S* stroma. *Bar* 0.05 mm. **O.** Testis. *ST* Seminiferous tubule, *Le* Leydig cells. **P.** Higher magnification of testis presented in O. *ST* Seminiferous

tubule, *Le* Leydig cells. **Q.** Tail of epididymis. *EC* epithelial cells, *S* stroma, *L* lumen. **R.** Higher magnification of epididymis presented in **Q.** *EC* epithelial cells, *S* stroma, *L* lumen. **S.** Higher magnification of epididymis tail in **Q.** *EC* epithelial cells, *S* stroma, *L* lumen. *Bar* 0.05 mm. **T.** Seminal vesicle. *EC* Epithelial cells, *L* lumen, *S* stroma. **U.** Higher magnification of seminal vesicle presented in **T.** *EC* Epithelial cells, *L* lumen, *S* stroma. **V.** Adenohypophysis. *SC* small cells. **W.** Higher magnification of adenohypophysis presented in **V.** *SC* small cells. **X.** Higher magnification of adenohypophysis presented in **W.** *SC* small cells. **Y.** Neurohypophysis. *NH* neurohypophysis, *AH* adenophyposis (pars intermediary). **Z.** Cerebral cortex. **AA.** Cerebellum. *ML* molecular layer, *GL* granular layer, *PC* Purkinje cell. **AB.** Higher magnification of cerebellum presented in **AA.** *ML* molecular layer, *GL* granular layer, *PC* Purkinje cell. **AC.** Liver. *CLV* centrolobular vein. **AD.** Higher magnification of hepatocytes presented in **AC.** *Bar* 0.05 mm.

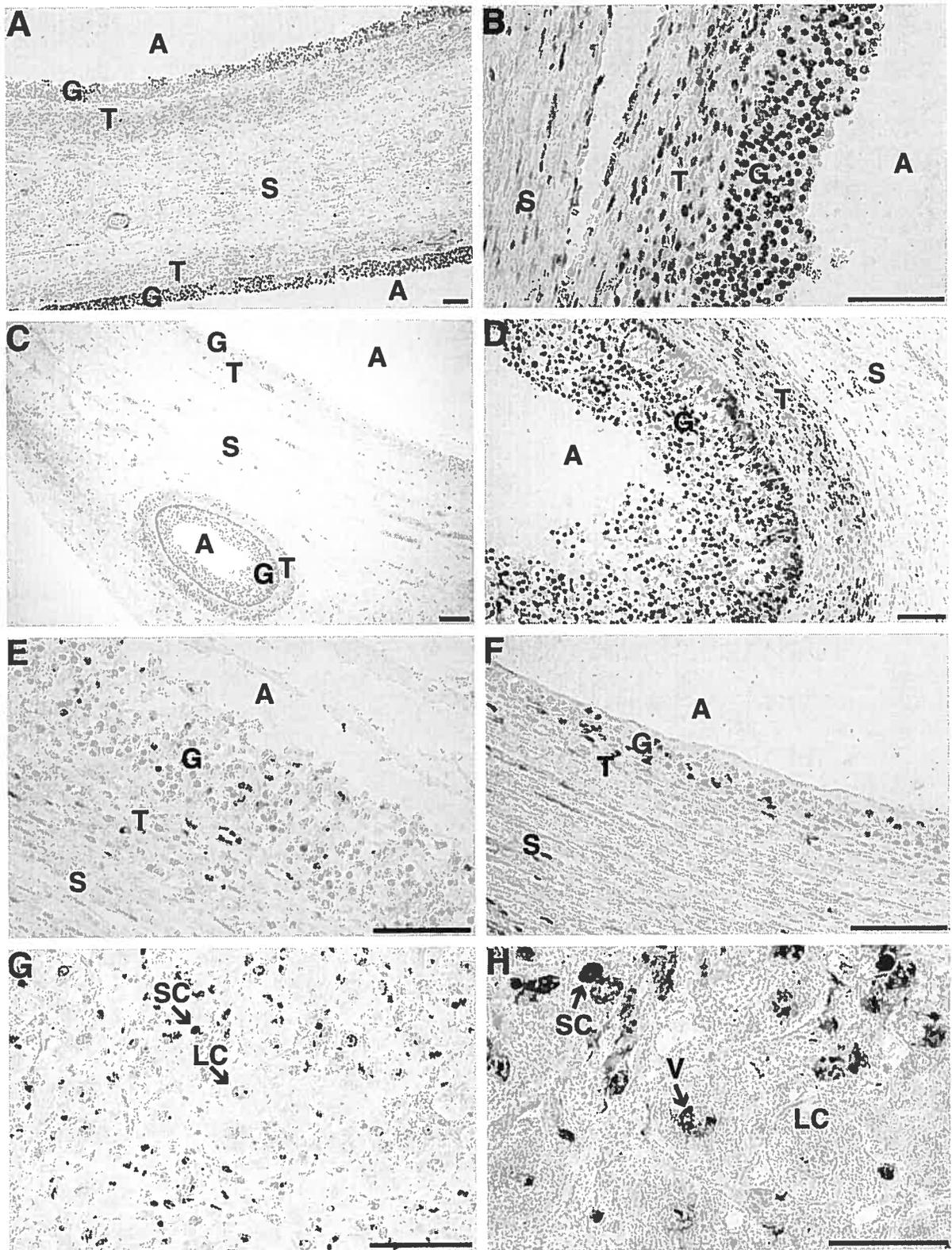


Figure 6

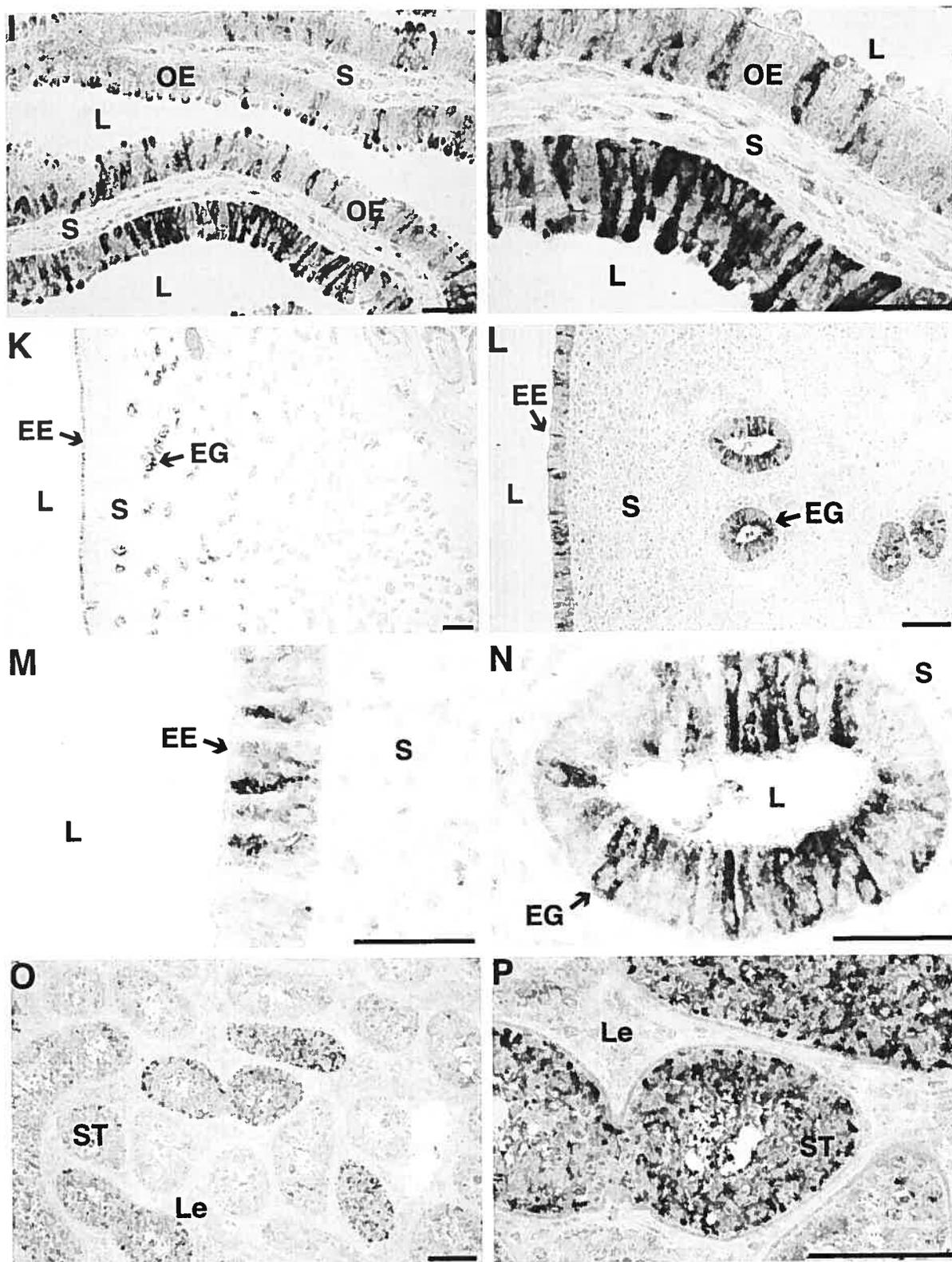


Figure 6

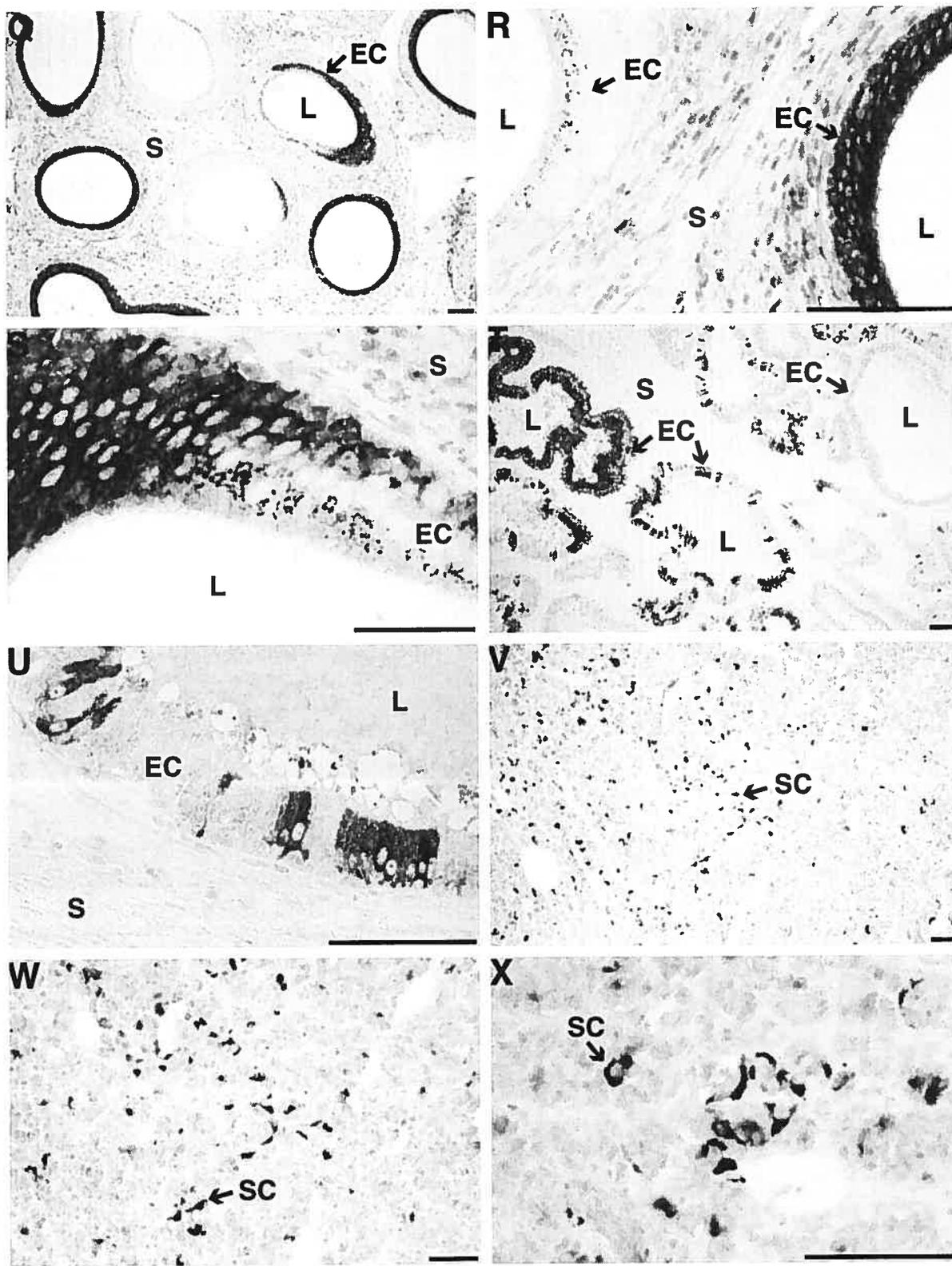


Figure 6

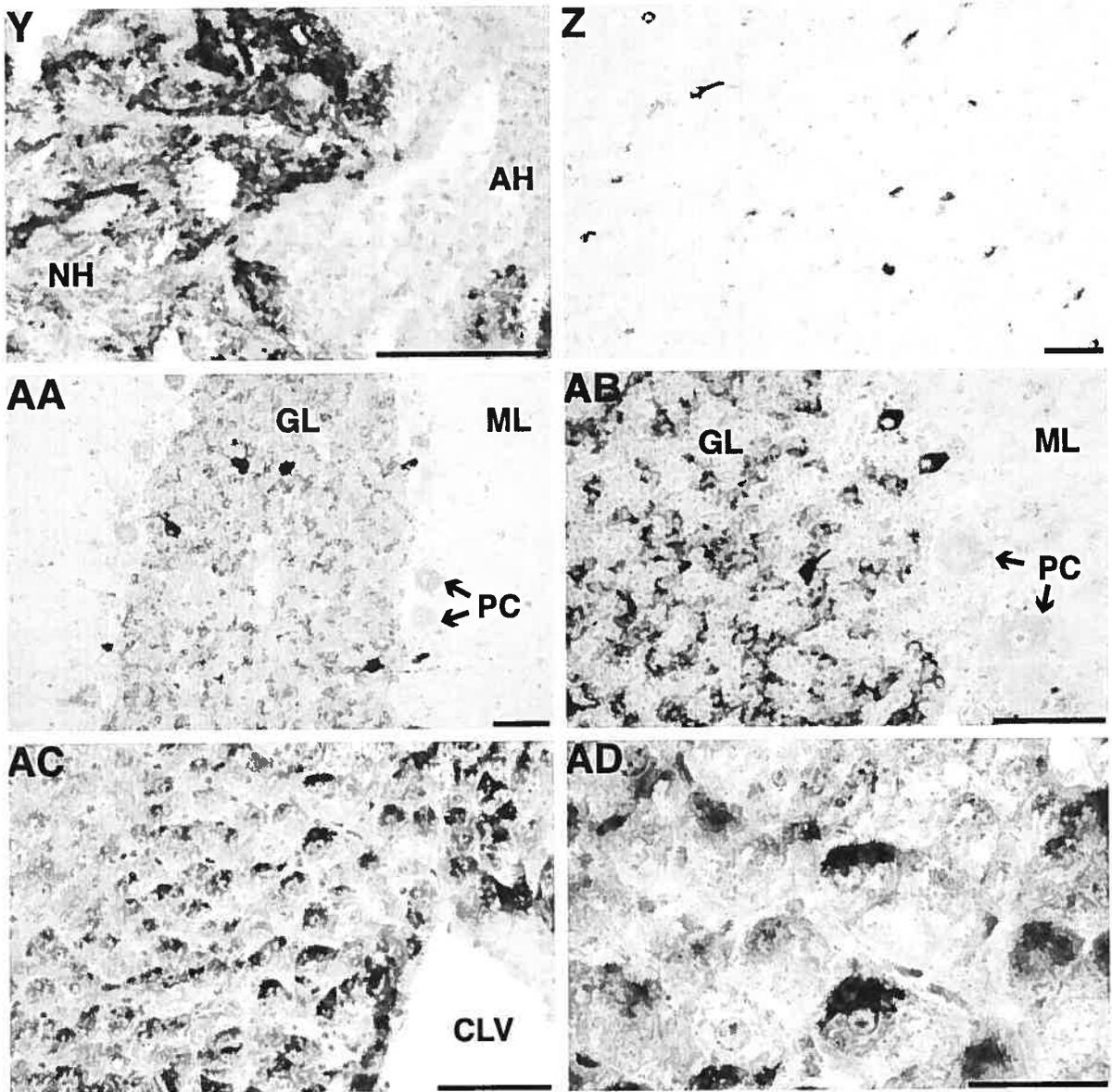


Figure 6

## CHAPITRE 5

## **4. Discussion**

Les mécanismes qui régissent la sélection et l'établissement de la dominance folliculaire ainsi que l'ovulation chez la vache sont encore peu connus. L'étude de l'expression des gènes exprimés lors de la dominance folliculaire permettrait de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces phénomènes physiologiques. L'activité fonctionnelle d'un gène donné peut être élucidée en comprenant le moment et l'amplitude de son expression à l'intérieur d'un type cellulaire (Tavares et al., 2001). L'expression des gènes dans les tissus constitue un phénomène fondamental retrouvé dans les systèmes biologiques ce qui nécessite de les caractériser et d'étudier leur mode d'expression (Franz et al., 1999). Diverses approches permettent l'identification et la caractérisation des gènes. L'approche de l'hybridation soustractive suppressive (Diatchenko et al., 1996, 1999) et de la caractérisation systématique ou aléatoire d'ADNc à partir d'une génothèque d'ADNc (Wiemann et al., 2001; Strausberg et al., 2002; Imanishi et al., 2004; Ota et al., 2004) ont été utilisées dans la présente recherche. Ces approches permettent l'isolement et la caractérisation de nouveaux gènes et participent à la compréhension de leur implication dans de nombreux mécanismes moléculaires menant à la fonction biologique.

### **4.1. Utilisation de la SSH pour l'étude de l'expression différentielle des gènes dans les follicules dominants**

La croissance folliculaire terminale incluant la sélection du follicule dominant (DF), l'établissement de la dominance ainsi que l'ovulation requiert l'expression d'un grand nombre de gènes dont certains restent encore à être identifiés. Les mécanismes

moléculaires qui assurent le passage du DF au follicule ovulatoire (OF) ne sont pas encore totalement élucidés. La relâche préovulatoire de la LH induit des changements dans divers compartiments du follicule ovarien déclenchant l'ovulation et induisant la maturation finale des cellules du complexe ovocyte cumulus (COC) ainsi que la différenciation des cellules de la granulosa (GC) en cellules lutéales. Récemment, plusieurs travaux ont été orientés sur les gènes induits dans le OF par la relâche préovulatoire de la LH (Lévesque et al., 2002; Richards et al., 2002; Hennebold, 2004). Celle-ci induit l'expression de gènes d'importance contribuant aux mécanismes de l'ovulation et de la lutéinisation mais renseigne aussi sur ceux qui sont éteints lors du passage du DF au OF. Bien que certains gènes clés subissant une répression causée par la LH/hCG dans les DF soient déjà connus, il est clair que plusieurs restent à être identifiés.

Nous avons utilisé l'approche de la SSH afin d'améliorer notre compréhension des bases moléculaires impliquées dans la dominance folliculaire et la transition d'un DF à un OF. Cette méthode d'analyse a permis d'enrichir puis d'identifier des gènes exprimés dans les DF et réprimés ou diminués dans les OF induits à l'hCG. Les ADNc des DF et des OF ont été générés à partir d'ARNm en utilisant la technique « *SMART cDNA synthesis* » qui permet d'augmenter les quantités d'ADNc générés à partir de quantités limitées d'échantillons d'ARNm grâce à l'application d'un nombre restreint de cycles de PCR (Endege et al., 1999). Nous avons utilisé la technique de la SSH du fait qu'elle n'est pas limitée aux gènes connus permettant ainsi l'identification de nouveaux gènes différenciellement exprimés (Chapitre 2; Diatchenko et al., 1999; Fayad et al., 2004). L'approche de la

SSH génère une représentation normalisée des gènes différentiellement exprimés sans tenir compte de leur abondance initiale contenue dans les échantillons à analyser. Elle permet le suivi de l'efficacité de la soustraction avant le criblage différentiel, minimise l'isolement de clones faux positifs et permet de générer des sondes pour l'analyse transcriptionnelle et le clonage d'ADNc complet. L'application de la SSH dans notre modèle d'étude a permis d'identifier avec succès des gènes précédemment caractérisés qui sont exprimés dans les GC de DF et réprimés par la LH/hCG dans les OF validant ainsi notre modèle physiologique et les techniques d'analyse utilisées.

Le choix des follicules à analyser dans le cadre de cette étude physiologique a permis de dissocier les différentes étapes du développement folliculaire au cours de la période périovulatoire tout en ciblant les GC, un compartiment clé du follicule. Le modèle que nous avons préconisé chez la vache n'induit pas d'artéfact dans l'expression génique puisqu'il a été réalisé *in vivo*. De plus, il procure l'avantage d'isoler les composants folliculaires de façon séparée et d'éviter l'utilisation d'homogénat total de l'ovaire tel qu'utilisé chez les rongeurs (Richards et al., 2002; Hennebold, 2004). Le DF de la première vague folliculaire a été choisi à J5 du cycle œstral (> 9 mm) puisqu'il est encore en pleine croissance et exprime pleinement son potentiel de dominance représentatif du follicule dominant ou préovulatoire en fin de cycle œstral. D'autre part, le DF de la première vague folliculaire a été induit à l'hCG afin d'obtenir des follicules ovulatoires au temps prédéfini. L'utilisation d'un modèle physiologique impliquant la relâche préovulatoire hypophysaire de la LH en fin de cycle œstral normal ou synchronisé aurait induit plus de variabilité entre le statut des follicules récupérés. Les critères morphologiques en relation aux traitements et le

suivi échographique des vaches ont permis de générer les DF et les OF. Le dosage des liquides folliculaires en hormones stéroïdiennes E2 et P4 ont permis de confirmer les différences fonctionnelles entre ces groupes de follicules. Les concentrations des hormones stéroïdiennes obtenues pour les différents stades folliculaires sont en accord aux valeurs déjà rapportées (Ireland & Roche, 1982, 1983). Les ARN totaux extraits des GC (incluant les COC) provenant des divers animaux ont été regroupés selon leurs types folliculaires avant de procéder à l'analyse par SSH. Cet exercice avait pour but de diminuer la variabilité de l'expression géniques entre les animaux afin de favoriser l'identification des gènes associés au stade folliculaire choisi. L'expression génique observée dans les DF a été comparée à l'expression dans les OF. La technique de la SSH a ainsi permis d'établir une génothèque soustraite d'ADNc DF-OF.

#### **4.1.1. Analyse de l'efficacité de la soustraction effectuée lors de la SSH**

L'approche de la SSH a permis la soustraction des transcrits communs entre les populations de DF et de OF. Les populations soustraites (DF-OF et OF-DF) et non soustraites (DF et OF) ont été analysées par PCR. À l'aide d'amorces spécifiques pour des gènes prédéterminés, l'efficacité de la soustraction a été validée en vérifiant l'abondance des ADNc avant de réaliser les étapes de clonage et de criblage de la génothèque soustraite. L'analyse des ADNc de la CYP19 et de la PGHS2 comme contrôles positifs, respectivement dans les DF et les OF, a servi à valider la soustraction par la SSH ainsi que les procédures de criblage différentiel. L'analyse de l'expression de l'ADNc codant pour CYP19 a démontré un enrichissement dans la population soustraite DF-OF comparativement à la population non soustraite DF

alors que ce gène était absent dans les populations soustraite OF-DF et non soustraite OF. Ce résultat confirme ceux déjà rapportés concernant l'expression de CYP19 dans les DF et sa répression par la LH/hCG (Tetsuka & Hillier, 1997; Bao & Garverick, 1998). Inversement, le transcrit pour la PGHS2 n'a pas été observé dans la population de DF-OF et de DF puisque la PGHS2 est fortement induite par la LH/hCG dans les OF 18 h suivant sa relâche (Sirois, 1994). Dans les follicules induits à l'hCG, nous avons démontré que l'ADNc de la PGHS2 était enrichi dans la population OF-DF comparativement à la population OF non soustraite. Ces résultats démontrent qu'au niveau moléculaire, les DF et OF générés étaient conformes aux observations antérieures concernant l'expression de CYP19 et PGHS2. De plus, ces contrôles ont permis de valider les étapes de soustraction et d'amplification pour l'établissement de la génothèque soustraite DF-OF.

#### **4.1.2. Analyse transcriptionnelle des gènes identifiés par la SSH**

Le criblage de la génothèque soustraite d'ADNc DF-OF a permis l'identification de 222 clones d'ADNc qui ont le potentiel d'être différentiellement exprimés sur un total de 940 clones analysés. Parmi ces gènes, certains sont connus comme étant exprimés dans les GC et dont les ARNm sont modulés par la LH/hCG permettant ainsi de valider le modèle expérimental utilisé dans ce travail. Ces gènes incluent le « *Apolipoprotein E Receptor 2* » (ApoER2), la carboxypeptidase D (CPD), la connexine 43 (CX43), CYP19, CYP11A, le récepteur à la FSH (FSHr) et la « *Serine Protease Inhibitor E2* » (SERPINE2). La validation de l'expression différentielle de certains de ces transcrits a été effectuée par analyse northern virtuel et par RT-PCR. L'approche du northern virtuel permet d'étudier l'expression

différentielle de gènes à partir de quantités limitées d'échantillons biologiques tout en respectant la représentativité de la population d'ARNm initiale (Endege et al., 1999). Il s'agit d'une approche reproductible, efficace et de nature semi-quantitative. L'approche de la RT-PCR a été envisagée pour les clones dont l'expression différentielle n'a pu être vérifiée par analyse northern virtuel due à leur d'expression plus faible. Les résultats obtenus avec CX43, CYP19, FSHr, la follistatine (FST) et INHBA confirment les résultats déjà observés pour ces divers facteurs et constituent une validation de notre approche (voir sections suivantes). Ces résultats permettent également de soutenir l'expression différentielle des nouveaux gènes qui ont été identifiés dans le cadre de cette étude, à savoir ARFGAP3, RPA2, PRG1 et TRB2.

#### **4.1.2.1. CYP19, CYP11A, ApoER2, CPD et SERPINE2**

La CYP19, encore appelée P<sub>450</sub> aromatasase, est impliquée dans la synthèse d'œstrogènes par la conversion des stéroïdes C19 en stéroïdes C18. L'enzyme CYP19 catalyse la conversion de l'androstènedione en œstrone et de la testostérone en E2. La CYP19 a servi de contrôle positif dans notre modèle d'étude puisqu'antérieurement, d'autres études ont démontré son expression essentiellement dans le DF (Tetsuka & Hillier, 1997; Bao & Garverick, 1998). L'expression de la CYP19 augmente au cours de la croissance folliculaire et elle atteint son maximum lorsque le DF atteint sa taille maximale suggérant son expression différentielle dans les DF (Sasano et al., 1989; Tamura et al., 1992; Tetsuka & Hillier, 1997; Bao & Garverick, 1998). Le gène CYP19 peut être considéré comme un marqueur de la dominance des follicules non atrophiques du fait de la capacité de ces derniers à produire des quantités d'E2 plus élevées que les follicules subordonnés et les petits follicules (Ireland & Roche, 1983;

Xu et al., 1995b; Mihm et al., 1997; Bao & Garverick, 1998; Sisco et al., 2003; Evans et al., 2004; Fayad et al., 2004). L'expression de CYP19 aussi bien que celle de l'E2 diminue dans le DF à la suite d'un traitement à la LH/hCG (Komar et al., 2001; Fayad et al., 2004). Nous avons trouvé que l'expression de la CYP19 dans les DF était plus élevée que dans les petits follicules et que cette expression était absente dans les OF. Ces observations sont en accord avec les résultats mentionnés ci-dessus. Les résultats obtenus avec CYP19 ont permis de valider l'efficacité de la soustraction de la génothèque DF-OF (Voir section 4.3.1) ainsi que les analyses de northern virtuel et de RT-PCR pour les différents échantillons de follicules et de CL.

Le gène correspondant à la CYP11A a été identifié à deux reprises à la suite du criblage de la génothèque soustraite d'ADNc DF-OF. Dans les tissus stéroïdogéniques tels que l'ovaire ou le testicule, l'étape initiale et limitante de la voie menant du cholestérol aux hormones stéroïdiennes est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol pour donner la prégnénolone. Cette réaction est réalisée sous l'action de la CYP11A localisée dans la membrane interne mitochondriale (John et al., 1984; Morohashi et al., 1984; Chung et al., 1986). L'analyse de l'expression de l'ARNm de la CYP11A par northern n'avait pas montré de différence entre les CG de DF provenant de la phase lutéale et de la phase folliculaire (Bridges & Fortune, 2003). L'expression de l'ARNm de la CYP11A a été également observée dans les cellules de la granulosa de follicules kystiques (Calder et al., 2001). Chez la femme, l'expression de l'ARNm de CYP11A dans les cellules de la granulosa était plus élevée dans les follicules dominants que dans les follicules de 3-7 mm (Jakimiuk et al., 2001). Ces résultats ont démontré que l'ARNm de CYP11A était surexprimé dans les

cellules de la thèque et de la granulosa d'ovaires poly kystiques et soutiennent l'idée que les cellules de la thèque sont hyper stimulées alors que les cellules de la granulosa peuvent être prématurément lutéiniques (Jakimiuk et al., 2001). La variation de l'expression de l'ARNm de CYP11A pourrait donc jouer un rôle important dans l'étiologie de l'hyperandrogénie qui est une caractéristique commune au syndrome d'ovaire polykystique (Gharani et al., 1997). L'expression différentielle de CYP11A lors de la dominance folliculaire pourrait jouer un rôle important dans la production d'androgènes menant à une plus grande synthèse d'E2 pour permettre le passage du DF à OF.

L'expression de ApoER2, le troisième ADNc le plus fréquemment identifié dans la génothèque soustraite DF-OF (Tableau 1, chapitre 2) et celle de la CPD ont démontré une augmentation dans les GC de DF chez l'espèce bovine (Sisco et al., 2003; Fayad et al., 2004). De plus, Fayad et al. (2004) ont rapporté que l'expression des ARNm de ApoER2 et de CPD était réduite dans les GC des OF stimulés à l'hCG et dans le CL. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans ce document pour la caractérisation des ADNc de la génothèque soustraite DF-OF. La protéine ApoER2 appartient à la famille des récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LDLR) localisés à la membrane cytoplasmique et reconnus pour importer des cargos riches en lipides dans la cellule (Willnow et al., 1999; Strickland et al., 2002). Toutefois, l'ARNm de ApoER2 n'était pas détecté dans le CL bovin, ce qui contraste avec les besoins du CL en lipides pour la stéroïdogénèse. Il a donc été suggéré que l'expression de ApoER2 dans les GC de DF pourrait être impliquée dans d'autres fonctions en plus du transport du cholestérol pour la stéroïdogénèse (Fayad et al.,

2004). De plus, l'augmentation de l'expression de CYP11A (production d'androgènes) et de CYP19 (production d'œstrogènes) en association avec l'augmentation de l'expression de ApoER2 suggère une plus grande production d'E2 pour supporter le développement des follicules. La CPD est une enzyme de type « *carboxypeptidase E-like* » qui serait impliquée dans le clivage peptidique (Song & Fricker, 1995). La CPD pourrait être impliquée, à la suite de l'action de la furine et des endopeptidases, dans le clivage de facteurs de croissance sécrétés et de leurs récepteurs qui transitent dans les granules de sécrétion (Varlamov et al., 1999) et qui pourraient être importants pour le développement folliculaire et la différenciation des GC. Des études supplémentaires seront nécessaires afin d'étudier l'expression et la fonction de ApoER2 et de CPD dans le développement folliculaire.

Le gène codant pour la protéine SERPINE2 a été récemment identifié par DDRT-PCR (Bédard et al., 2003) et par SSH (Fayad et al., 2004) comme un gène différentiellement exprimé dans les GC de DF en croissance. Une analyse par RT-PCR semi-quantitative a démontré que l'expression de l'ARNm de SERPINE2 était contrôlée de façon spatio-temporelle associée à une expression plus élevée dans le DF comparativement aux petits follicules non sélectionnés ( $\leq 4$  mm; Bédard et al., 2003). L'expression de l'ARNm de SERPINE2 a été comparée par northern virtuel entre des follicules à différents stades du développement folliculaire (Fayad et al., 2004). Les résultats ont démontré que l'ARNm de SERPINE2 était principalement exprimé dans les GC de DF comparativement aux SF ( $\leq 4$  mm) ou aux OF induits à l'hCG et le CL, ce qui est conforme aux résultats obtenus dans cette étude. La superfamille de SERPIN consiste en de nombreuses protéines servant à diverses fonctions dont

l'inhibition de protéases extracellulaires et intracellulaires (Silverman et al., 2001). L'expression dans les follicules de sérine protéases telles que l' « *urokinase-plasminogen activator* » (uPA) et le « *tissue of plasminogen activator* » (tPA), la thrombine et d'autres sérine protéases suggère que la protéine SERPINE2 puisse agir comme un important modulateur de l'activité protéasique dans les follicules en croissance. La stimulation de l'expression des inhibiteurs des PA, en l'occurrence PAI-1 et PAI-2, dans les follicules préovulatoires bovins après la relâche des gonadotropines (Dow et al., 2002), participe à contrôler le remodelage de la matrice extracellulaire au moment de la rupture du follicule.

#### 4.1.2.2. CX43

La fonction coordonnée des différents compartiments du follicule, de l'ovocyte et des cellules somatiques de la granulosa et du cumulus est rendue possible par la présence d'un réseau de communication généré par les jonctions perméables entre les cellules. De multiples protéines nommées connexines et en particulier la CX43 sont exprimées à l'intérieur du follicule ovarien (Johnson et al., 1999, 2002; Nuttinck et al., 2000; Sommersberg et al., 2000; Juneja, 2003). Les connexines sont des membres d'une large famille de protéines membranaires et chacune est le produit d'un gène distinct (Kidder & Mhawi, 2002). La CX43 représente la protéine des jonctions perméables la plus abondamment exprimée par le follicule ovarien. La CX43 ainsi que la CX37 sont essentielles pour la croissance folliculaire normale (Nuttinck et al., 2000). Ces connexines sont exprimées dans la plupart des GC de follicules préovulatoires humains et reflètent le stade de maturité des follicules (Tsai et al., 2003). Des études d'immunohistochimie et d'analyse western blot ont

démontré que la CX43 était absente dans les follicules primordiaux mais présente dans les GC des follicules primaires et secondaires et des follicules antraux (Johnson et al., 1999). L'expression de la CX43 jouerait un rôle important dans la survie des cellules de la granulosa. Les souris déficientes en CX43 ont montré des gonades inhabituellement petites chez les deux sexes du fait de la déficience en cellules germinales (Juneja et al., 1999). Ces études ont montré que la folliculogenèse pouvait se poursuivre jusqu'au stade primaire en absence de la CX43 mais le stade suivant ne se poursuivait pas normalement.

L'expression de la CX43 est très élevée dans les follicules sains mais diminue durant l'atrésie (Johnson et al., 1999). La CX43 a été identifiée dans notre modèle d'étude avec une expression très élevée dans les DF comparativement aux OF et aux petits follicules. De plus, une baisse significative de la concentration de l'ARNm de la CX43 survient 24h après une incubation avec la LH puis elle disparaît après l'ovulation (Granot & Dekel, 1998). La LH inhibe l'expression de la CX43 en réduisant le rythme de sa traduction. Cet effet est médié par la protéine kinase A (PKA) et les voies de signalisation de MAPK (Kalma et al., 2004). Nous avons observé que l'expression de la CX43 était réduite de 17 fois, 23h suivant l'injection d'hCG comparativement aux DF. Ces résultats corroborent avec ceux mentionnés ci-dessus.

La fonction du follicule ovarien de produire à point nommé un ovocyte mature et fécondable est accomplie grâce à une altération des communications entre les cellules. Cette altération est contrôlée par les gonadotropines et médiée par les jonctions perméables (Granot & Dekel, 2002). La LH interrompt les communications

entre les cellules à l'intérieur du follicule ovarien menant à une baisse des concentrations d'AMPc dans l'ovocyte suivie de la reprise de la méiose (Granot & Dekel, 1998). Les GC lutéinisées des gros follicules sont relativement quiescentes en ce qui concerne l'expression en ARNm des connexines (Tsai et al., 2003). Dès les premiers stades du développement embryonnaire de l'ovaire, la CX43 est exprimée dans les principaux types cellulaires impliqués dans le contrôle de la fertilité femelle (Perez-Armendariz et al., 2003). En son absence, les GC arrêtent de croître à un stade préantral précoce (Gittens et al., 2003). Même si la CX43 n'est pas la seule protéine des jonctions perméables présente dans les GC des follicules préantraux précoces, elle est la seule qui a une contribution significative au couplage intercellulaire (Gittens et al., 2003). Sa présence est donc obligatoire et augmente tout au long du développement folliculaire. Cependant, l'expression de l'ARNm de CX43 diminue radicalement durant le stade fonctionnel du corps jaune (Itahana et al., 1996). L'arrêt de son expression occasionnée par la LH/hCG contribuerait possiblement à la différenciation des GC en cellules lutéales.

#### **4.1.2.3. FSHr et LHR**

Il est admis que la FSH favorise la multiplication des GC mais aussi certains aspects de leur différenciation telle que la stéroïdogenèse. Le FSHr se retrouve à la surface des membranes des GC et son inactivation, par des mutations dans sa séquence, empêche la progression du développement folliculaire ovarien au-delà du stade pré-antral (Tapanainen et al., 1998; Layman, 2000). Pour le FSHr, comme pour la FST (voir section 4.1.2.4), l'approche du northern virtuel ne nous a pas permis de détecter l'expression de ces deux clones identifiés dans notre étude. Ceci pourrait

s'expliquer par la très faible expression de leurs ARNm dans les tissus analysés. Les clones correspondant au FSHr ont été identifiés à deux reprises dans la génothèque soustraite (DF-OF). Cette fréquence assez faible n'explique pas l'incapacité à détecter un signal puisque des clones identifiés une seule fois donnent des résultats évidents (voir RPA2, section 4.1.2.7). L'approche de la PCR a alors été choisie pour analyser l'expression différentielle du FSHr. Les résultats obtenus sont conformes aux études antérieures (Knight & Glister, 2003) et démontrent une expression du FSHr dans les DF et une réduction dans les OF.

Les résultats observés dans les ovaires démontrent l'implication du FSHr dans le développement folliculaire antral du fait de sa présence du stade de petits follicules au stade de DF, de sa réduction dans les OF et son absence dans le CL. La production d'ARNm du FSHr ne différait pas entre les SF et les DF. Ces résultats sont en accord avec le fait que les petits follicules (2-4 mm) nécessitent l'expression du FSHr par les GC pour permettre leur recrutement provoqué par l'augmentation de la concentration circulante de la FSH (Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996). Ce phénomène se produit 2 à 3 reprises durant le cycle œstral bovin (Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2001). La baisse de l'expression du FSHr dans les GC suite à la relâche préovulatoire des gonadotropines coïncide avec l'initiation de la lutéinisation des GC. Cette baisse est aussi en accord avec l'observation selon laquelle l'ARNm du FSHr diminue dans les GC bovines mises en culture avec des concentrations élevées de FSH (Houde et al., 1994).

Le criblage de la génothèque DF-OF n'a pas permis d'identifier le LHr mais nous avons toutefois analysé son expression dans les différents groupes de follicules

pour vérifier la régulation de son expression. Il s'agit d'un récepteur à sept passages transmembranaires (Loosfelt et al., 1989; McFarland et al., 1989; Minegishi et al., 1990) dont l'expression est modifiée dans les follicules préovulatoires après la LH/hCG. L'absence de clones correspondant au LHR suite au criblage de la génothèque soustraite pourrait s'expliquer de plusieurs façons. L'explication la plus plausible concerne la caractérisation limitée du nombre de clones. Nous avons criblé 940 clones et nous avons seulement caractérisé les clones dont l'expression différentielle suite à l'hybridation était évidente, soit 222 clones. Les puits sans signal reflétant possiblement des gènes faiblement exprimés n'ont pas été pris en considération pour être caractérisés par séquençage. Un plus large séquençage de tous les clones aurait probablement permis de retrouver le LHR. Une autre explication pourrait être située à l'étape de la soustraction. Étant donné que le LHR est exprimé dans le DF et le OF, à des taux variables certes, la soustraction n'aurait pas permis un enrichissement de ce clone de sorte que la différence entre le DF et le OF était faible. Cette faible différence n'aurait pas permis à la méthode de criblage de détecter le LHR dans le DF. Afin de vérifier cette interprétation, nous avons procédé à une analyse par RT-PCR ciblant la comparaison de l'expression du LHR dans les différents groupes de follicules et le CL. Cette analyse a mis en évidence la présence de deux transcrits dont l'expression était absente dans les petits follicules. Le LHR est initialement exprimé dans les cellules thécales des follicules antraux et est exprimé plus tardivement dans les GC au moment de la sélection du DF (Peng et al., 1991).

La caractérisation du LHR a été réalisée avec succès chez plusieurs espèces animales et a montré une homologie structurale significative entre les récepteurs dans

les deux sexes (Themmen et al., 1998; Remy et al., 2001; Liao et al., 2002). De nombreux variants du LHR provenant d'épissage alternatif ont été mis en évidence chez le porc, la souris, le rat et l'espèce humaine (Loosfelt et al., 1989; McFarland et al., 1989; Minegishi et al., 1990; Abdennebi et al., 2002; Madhra et al., 2004). Plusieurs des ADNc du LHR isolés à partir de ces espèces codent pour des formes incomplètes et possiblement inactives (Bacich et al., 1994). Des cellules COS-7 transfectées avec des ADNc contenant le cadre de lecture ouvert pleine longueur du LHR ont permis de démontrer la liaison de l'hCG au LHR dans ces cellules (Loosfelt et al. 1989). Ainsi, la protéine du LHR, traduite à partir de l'ARNm pleine longueur, possède les fonctions physiologiques escomptées (Loosfelt et al., 1989).

Les quatre formes incomplètes du LHR désignées B, C, D et E sont le résultat de l'épissage alternatif de la forme pleine longueur désignée forme A (Loosfelt et al., 1989; Bernard et al., 1990; Minegishi et al., 1990; Tsai-Morris et al., 1990; Bacich et al., 1994). Les formes F et G ont été par la suite isolées chez les espèces ovine (Bacich et al., 1994) et bovine (Kawate & Okuda, 1998). Chez le porc, au moins trois variants de l'ARNm du LHR sont présents dans les cellules du cumulus en plus de la forme totale (Shimada et al., 2003). Cet épissage alternatif semble jouer un rôle important dans le contrôle saisonnier et physiologique de l'expression du LHR dans les cellules de la thèque chez les brebis (Abdennebi et al., 2002). Nous avons caractérisé chez l'espèce bovine une isoforme tronquée du LHR dans laquelle l'exon 10 au complet est absent et qui correspondrait à la forme F (annexe 2). Nous avons démontré que l'expression de l'isoforme F bovine était réduite dans les GC des DF et les cellules lutéales lorsque comparée au récepteur complet. L'isoforme F du LHR

(LHr-F) a été également observée dans le CL bovin et son expression augmente durant le développement du CL (Kawate & Okuda, 1998). L'absence de l'exon 10 n'altère pas l'action de la gonadotropine chorionique mais l'action de la LH est significativement diminuée (Muller et al., 2003). Les deux gonadotropines, chorionique et hypophysaire, diffèrent par le peptide carboxyterminal qui est présent dans la séquence chorionique mais absent dans celle de la LH. Le LHr-F convertit le signal de la LH plus faiblement comparé au récepteur complet (Muller et al., 2003). Bien qu'il ne joue pas de rôle dans la liaison de l'hormone, l'exon 10 est important pour l'activation de la LH par un mécanisme impliquant probablement des changements conformationnels extracellulaires. L'exon 10 pourrait jouer un rôle permissif en favorisant la libération du récepteur d'une restriction conformationnelle prévenant son activation (Muller et al., 2004). Dans le cas du récepteur tronqué, LHr-F, son activation serait favorisée par le peptide carboxyterminal de la gonadotropine chorionique (Muller et al., 2004). Il est intéressant de constater que chez les singes du Nouveau Monde (Platyrrhini), l'ARNm de l'exon 10 est absent et le récepteur LHr-F, baptisé LHR type II, est le récepteur naturel chez cette lignée de singes (Gromoll et al., 2003). Cummulativement, ces résultats peuvent suggérer que la fonction biologique du LHr-F chez l'espèce bovine serait de réduire la signalisation de la LH endogène dans les GC des DF et le CL en fonction de la variation de l'amplitude et de la pulsativité de la LH circulante.

#### 4.1.2.4. INHBA et FST

Le système inhibine/activine contribue à la régulation endocrinienne du système reproducteur et est principalement issu des gonades (Ozawa et al., 2001). Les inhibines et activines sont des glycoprotéines dimériques qui appartiennent à la superfamille des TGF- $\beta$ . Elles ont d'abord été identifiées à travers leur habileté à moduler la sécrétion de la FSH à partir de l'hypophyse. L'inhibine supprime la sécrétion de la FSH tandis que l'activine stimule sa sécrétion (Knight & Glister, 2001). La sous-unité bêta A de l'inhibine/activine (INHBA) était le clone d'ADNc le plus souvent identifié dans la génothèque soustraite DF-OF (Tableau 1, chapitre 2). Les activines sont composées de deux sous-unités, les sous-unités  $\beta$ A- et  $\beta$ B- qui peuvent homodimériser ou hétérodimériser pour former l'activine A, B ou AB (Woodruff, 1998). Les sous-unités  $\beta$ A- et  $\beta$ B- peuvent aussi hétérodimériser avec une sous-unité  $\alpha$  pour former l'inhibine. L'activine est produite par les GC et agit de façon paracrine/autocrine pour supporter le développement folliculaire (Éthier & Findlay, 2001). L'inhibine et la follistatine (FST) sont aussi produites par les GC où elles contrôlent, dans le milieu extracellulaire, les actions stimulatrices de l'activine sur la croissance folliculaire et la stéroïdogénèse (Wrathall et al., 1995; Woodruff, 1998; Welt et al., 2002). Les études d'expression spatio-temporelle de l'INHBA ont montré une expression plus élevée de l'INHBA dans les follicules œstrogéniquement actifs comparés aux petits follicules (Ireland & Ireland, 1994; Sunderland et al., 1996; Sisco et al., 2003; Fayad et al., 2004) alors que l'expression de l'ARNm de l'INHBB était stable (Ireland & Ireland, 1994; Sunderland et al., 1996). Ces résultats

corroboient nos observations sur l'augmentation de l'ARNm de l'INHBA dans les GC de DF comparés aux SF et sa diminution suivant une stimulation à l'hCG.

L'expression de l'ARNm de la sous-unité  $\alpha$  et celle de l'INHBA varient de façon différente dans les follicules bovins aux divers stades du développement folliculaire (Ireland & Ireland, 1994). De la même façon, chez la poule, l'ARNm de l'INHBA atteignait son taux d'expression le plus élevé dans les follicules les plus gros et était inversement reliée à l'ARNm de la sous-unité  $\alpha$  durant le développement folliculaire (Chen & Johnson, 1996).

Les sous-unités  $\beta$ A- peuvent dimériser entre elles pour former l'activine A ou avec une sous-unité  $\alpha$  pour former l'inhibine A mais nos analyses sur l'expression de l'ARNm n'ont pas permis d'identifier lequel des dimères protéiques était préférentiellement formé. Des études sur la quantification de la sous-unité  $\alpha$  de l'inhibine libre ou du dimère inhibine-A par RIA ou IRMA dans le liquide folliculaire, ont rapporté une diminution de l'inhibine dimérique en relation à la croissance des follicules œstrogéniquement actifs (Guilbault et al., 1993; Sunderland et al., 1996). Il a été démontré que l'activine A augmentait dans le liquide folliculaire du DF comparé aux follicules subordonnés (Ginther et al., 2002). L'activine promouvoit la prolifération des GC et la stéroïdogénèse et potentialise les actions de la FSH sur les GC en augmentant l'expression du FSHr (Hasegawa et al., 1988; Xiao et al., 1992; Li et al., 1995). De plus, les observations réalisées chez des souris déficientes en sous-unité  $\alpha$  de l'inhibine (Matzuk et al., 1992) ou en récepteur d'activine de type IIB (Matzuk et al., 1995) supportent encore davantage le rôle capital de l'activine dans le développement folliculaire. En effet, chez les souris

n'ayant pas le récepteur d'activine de type II, la FSH est supprimée et la performance reproductive de ces souris est défectueuse (Matzuk et al., 1995) confirmant le rôle de la signalisation de l'activine dans la libération des gonadotropines.

Cummulativement, ces résultats sont en accord avec l'observation selon laquelle le follicule dominant œstrogéniquement actif exprimait une plus grande quantité de l'ARNm de l'INHBA contribuant à augmenter la sécrétion de l'activine A. Ces résultats suggèrent aussi que l'activine A contribue au développement du DF à travers une action paracrine et que la relâche préovulatoire de la LH abroge son expression.

Le gène codant pour la FST est exprimé dans les tissus ovariens et testiculaires bovins (Houde et al., 1994). La protéine FST se retrouve sécrétée dans le liquide folliculaire où elle se lie l'activine avec une grande affinité et neutralise son activité biologique sur les GC (Welt et al., 2002; Lin et al., 2003). De plus, la FST inhibe la sécrétion de la FSH par les cellules hypophysaires comme le fait l'inhibine. Dans l'ovaire, les GC des follicules antraux et les cellules de la granulosa lutéinisées sont les principaux sites d'expression de l'ARNm et de la protéine de la FST alors que les cellules thécales, le stroma et l'ovocyte en sont dépourvus (Shimasaki et al., 1989; Roberts et al., 1993; Braw-Tal, 1994; Tisdall et al., 1994). La purification de l'inhibine, l'activine et la follistatine à partir de sources gonadales suggère que ces trois protéines possèdent des actions biologiques à l'intérieur des gonades (Welt et al., 2002). Des analyses moléculaires ont montré que la FST présente plusieurs isoformes codées par un gène unique et provenant d'épissage alternatif, de glycosylation et de clivage protéolytique (Robertson et al., 1987; Ueno et al., 1987b; Shimasaki et al., 1988). Notre analyse par RT-PCR a révélé la présence d'un seul

transcrit correspondant au gène de la FST. L'expression de l'ARNm de la FST n'avait montré aucune différence entre le DF comparé aux SF confirmant les précédentes observations chez l'espèce bovine où ni l'ARNm (Fayad et al., 2004) ni la protéine dans le liquide folliculaire (Knight & Glister, 2003) n'étaient différenciellement exprimés.

Des souris transgéniques surexprimant la FST (Guo et al., 1998) ou déficientes en FST (Jorgez et al., 2004) présentent une diminution du développement folliculaire. Des études *in vitro* sur des GC bovines ont démontré que la FST agirait comme un facteur paracrine réduisant l'action biologique de l'activine A par la signalisation de Smad2 (Glister et al., 2004). Toutes ces observations supportent un rôle capital de l'activine dans la prolifération et la différenciation des GC alors que la FST agirait comme un modulateur de l'action de l'activine sur la croissance folliculaire. Au moment de l'ovulation, l'expression de l'ARNm de la FST diminue dans les OF et ne fut pas détectée dans le CL. La baisse de l'expression de la FST dans les OF plutôt que son absence concomittant à une réduction drastique de l'ARNm de l'INHBA pourrait signifier que la FST neutraliserait l'activine extracellulaire au moment de l'ovulation et de la différenciation des GC en cellules lutéales.

#### **4.1.2.5. PRG1**

L'ADNc de PRG1, un membre de la famille des protéoglycans, aussi connu sous le nom de serglycine, a été identifié à cinq reprises lors du criblage de la génothèque soustraite d'ADNc DF-OF. Les protéoglycans (PRG) sont des macromolécules formées par une protéine sur laquelle une ou plusieurs chaînes

latérales de glycosaminoglycans (GAG) sont attachées de façon covalente (Salustri et al., 1999). Il existe plusieurs types de PRG dont certains sont présents dans les GC et les cellules de la thèque (Ishigura et al., 1999). La synthèse des PRG change significativement durant le développement du follicule ovarien et l'atrésie (Salustri et al., 1999). Les PRG semblent jouer un rôle critique dans la composition physique du liquide folliculaire et ils sont importants pour la migration cellulaire et d'autres fonctions cellulaires (Salustri et al., 1999). Les PRG et les protéines sécrétées par les cellules du cumulus sont des composants importants de la matrice extracellulaire (EC). Plusieurs PRG ont l'habileté d'interagir aux protéines de la matrice EC par leurs chaînes GAG ou par la protéine (Zhuo & Kimata, 2001). Nous avons évalué par analyse northern virtuel que le clone PRG1 que nous avons identifié s'hybridait à un transcrit unique de 1.4 kb ce qui correspond au transcrit de PRG de 1.3 kb isolé chez l'espèce humaine (Stevens et al., 1998). Les séquences dans les régions 5'- et 3'-UTR de l'ADNc du PRG humain, de la souris et du rat semblent être bien conservées (Avraham et al., 1989). La séquence partielle de l'espèce bovine obtenue dans notre analyse et se situant dans la région 3' codant et en 3'-UTR présentait 80 % d'identité avec la séquence humaine de PRG.

Plusieurs rôles biologiques ont été attribués aux PRG dans le contrôle de la croissance et la différenciation dans la matrice EC. Ces rôles sont en relation avec l'attachement cellulaire et la migration, la liaison et le contrôle de facteurs de croissance, la liaison d'enzymes protéolytiques et des inhibiteurs de protéases (Prydz & Dalen, 2000; Kolset et al., 2004). La sécrétion de plusieurs PRG est stimulée par la FSH dans les GC bovines (Bellin et al., 1983). En accord avec ces observations, nos

résultats ont montré que l'ARNm de PRG1 était exprimé à une amplitude plus élevée dans les SF comparativement aux DF et que son expression était radicalement réduite dans les OF. La réduction de l'expression de PRG1 pourrait potentiellement contribuer à la maturation folliculaire en rapport aux observations réalisées chez la femme (Franchimont et al., 1990). De plus, il a été montré récemment que l'ARNm d'un autre membre des PRG, la « *Chondroïtin sulfate proteoglycan 2* » (CSPG2), aussi connue sous le nom de versican, était exprimée plus fortement dans les GC des DF comparativement aux SF (Fayad et al., 2004). Ces deux membres des PRG, PRG1 et CSPG2, présentent des expressions variables dans les GC de SF, de DF et de OF. Ces résultats sont en concordance avec les observations obtenues sur la nature variable des GAG purifiés à partir du liquide folliculaire en relation au développement folliculaire (Grimek et al., 1984; McArthur et al., 2000). Il serait intéressant de démontrer ultérieurement les effets stimulateurs de la FSH sur la production de PRG1 et de CSPG2.

#### 4.1.2.6. ARFGAP3

L'« *ADP-ribosylation factor GTPase Activating Protein 3* » (ARFGAP3) est un membre récemment caractérisé de la famille des « *ADP-ribosylation Factor* » (ARF) des petites GTPase (Zhang et al., 2000; Liu et al., 2001) qui est actif en se liant à la GTP et inactif en se liant à la GDP. L'ARFGAP3 a été identifiée chez l'espèce humaine où elle est fortement exprimée dans les tissus endocrines retrouvés dans les testicules, le pancréas, l'hypophyse ou la prostate (Zhang et al., 2000; Liu et al., 2001) ainsi que chez le rat (Huber et al., 2001). L'expression de l'ARFGAP3 fut également détectée dans des extraits totaux d'ovaire humain mais le statut

physiologique de l'ovaire n'a pas été mentionné (Zhang et al., 2000). L'expression de l'ARNm d'ARFGAP3 était six fois plus élevée dans les testicules adultes que dans l'ovaire total (Zhang et al., 2000) suggérant une fonction plus importante dans la reproduction mâle. Des expériences sur la protéine ARFGAP3 humaine ont permis de démontrer qu'il s'agit d'une protéine cytosolique et est principalement concentrée dans la région périnucléaire (Liu et al., 2001). Cette protéine pourrait prendre part dans le transport de vésicules et dans la sécrétion de protéines régulatrices variées dans les glandes endocrines (Regazzi et al., 1992). La protéine ARFGAP3 contribue au bourgeonnement des vésicules en augmentant l'activité GTPase de l'« *ADP-Ribosylation Factor 1* » (ARF1; Bigay et al., 2003). Il a été démontré que l'ARFGAP3 de la levure, appelée Gcs1, pouvait interagir avec des vésicules phospholipidiques (Huber et al., 2001). Nous avons démontré par analyse northern virtuel la présence d'un transcrit de 3.5 kb correspondant au gène d'ARFGAP3 bovin en accord avec la grandeur de 3.2 kb de l'ADNc de l'ARFGAP3 humain (Ota et al., 2004). De plus, cette analyse a révélé que l'expression de l'ARNm de l'ARFGAP3 était réduite dans les OF comparativement aux DF. La plus forte expression observée dans les GC des DF pourrait être interprétée comme une augmentation du trafic membranaire pour le transport de facteurs nécessaires au développement du DF et/ou des activités de signalisation par interaction avec d'autres protéines dans le DF stimulant sa croissance comparativement aux autres stades folliculaires.

#### 4.1.2.7. RPA2

La « *Replication protein A2* » (RPA2) a été identifiée dans les GC de DF. Initialement, la RPA2 a été isolée à partir de cellules humaines (Erdile et al., 1990,

1991). Elle est aussi décrite sous les termes « *Replication Factor A* » (RFA), « *Single-Stranded-DNA Binding Protein* » (SSB; Kenny et al., 1989) ou HeLa SSB. L'analyse northern virtuel a démontré la présence de deux transcrits de 2.1 kb et de 5 kb pour la RPA2 bovine. Le transcrit de 2.1 kb correspond à l'ADNc humain de 1.7 kb alors que l'isoforme de 5 kb pourrait représenter une forme non épissée de plus haut poids moléculaire. Toutefois, des études de l'expression d'ARNm de la RPA2 par analyse northern n'ont pas été rapportées chez d'autres espèces. L'expression la plus élevée de l'ARNm de la RPA2 bovine a été observée dans les GC des DF alors qu'elle était réduite par l'hCG dans les OF. La RPA se compose de trois sous-unités, RPA1, RPA2 et RPA3 (Erdile et al., 1990, 1991; Umbricht et al., 1993) présentant trois domaines fonctionnels (Gomes & Wold, 1996) : un domaine N-terminal non requis pour la liaison de l'ADN, un domaine central de liaison de l'ADN et un domaine C-terminal essentiel pour les interactions entre les sous unités. La sous-unité RPA1 de 70 kDa peut subir une protéolyse et donner la forme de 53 kDa (Kenny et al., 1990; Nasheuer et al., 1992). La taille des sous-unités RPA2 et RPA3 varient selon les auteurs entre 30 (Erdile et al., 1990), 32 (Nasheuer et al., 1992) et 34 kDa (Kenny et al., 1990) pour la RPA2 et entre 14 (Erdile et al., 1990; Umbricht et al., 1993) et 11 kDa (Kenny et al., 1990) pour la RPA3. La RPA est donc un complexe hétérotrimérique de protéines liant l'ADN simple brin et joue de multiples rôles dans le métabolisme de l'ADN eucaryotique incluant la réplication, la réparation et la recombinaison homologue (Iftode et al., 1999; Mer et al., 2000; Wang et al., 2001; Millership et al., 2004). Après des dommages causés à l'ADN, la RPA subit une phosphorylation qui redirige ses actions vers une fonction de réparation de l'ADN au détriment de sa fonction de réplication (Wold, 1997; Wang et al., 2001).

La phosphorylation de plusieurs protéines dont la RPA mène à leur inactivation suggérant que la phosphorylation est importante dans la prévention de la réplication (Henneke et al., 2003). La RPA2 est une cible de phosphorylation pour la « *DNA-dependant-Protein Kinase* » (DNA-PK; Iftode et al., 1999) et sa phosphorylation joue un rôle modulateur significatif dans la réponse cellulaire au dommage causé à l'ADN et module l'expression des gènes (Wold, 1997). Il a été démontré que la phosphorylation du domaine N-terminal de la RPA2 module les interactions entre la RPA et l'ADN double brin (Binz et al., 2003). La phosphorylation semble causer des changements conformationnels du complexe RPA contrôlant ainsi son activité (Binz et al., 2003). Chez la Drosophile, la forme non phosphorylée de la RPA2 est plus abondante à l'interphase et la forme phosphorylée à la mitose (Mitsis, 1995). Dans les ovaires de Drosophile, une quantité relativement importante de la RPA2 a été observée durant les premiers stades mitotiques de l'ovogenèse (Mitsis, 1995). L'apparition de la forme phosphorylée coïncide avec un transfert massif de matériels contenus dans les cellules somatiques nourricières vers l'ovocyte et se fait juste avant la rupture de la membrane nucléaire (Mitsis, 1995). La phosphorylation de la RPA2 pourrait ainsi résulter, au moins chez la drosophile, à sa libération à partir des noyaux des cellules somatiques et son stockage dans l'ovocyte. Dans le système reproducteur, seule la forme non phosphorylée de la RPA2 est observée dans les embryons durant la réplication de l'ADN contrairement aux autres systèmes où la forme phosphorylée a été corrélée à la phase S (Mitsis, 1995). Chez la vache, les sous-unités RPA1 et RPA2, purifiées à partir du thymus de veau, sont phosphorylées par la « CDC2-cyclin B kinase » (Nasheuer et al., 1992). Le rôle biologique de la RPA2 dans la croissance cellulaire et la survie concorde avec son

expression très élevée que nous avons observé dans le DF en développement. De plus, il a été montré que Menin (MEN1), un gène suppresseur de tumeur et exprimé dans l'ovaire (Stewart et al., 1998), interagirait avec la RPA2 et se colocalise avec cette dernière dans le noyau (Sukhodolets et al., 2003). Ainsi, RPA2 et MEN1 pourraient contribuer à la prévention de l'atrésie dans le DF en développement.

#### 4.1.2.8. Perspectives

Nous avons généré une génothèque soustraite d'ADNc DF-OF à partir de laquelle 940 clones d'ADNc ont été choisis aléatoirement pour préparer des macro-réseaux. Ces derniers furent criblés en utilisant des sondes non soustraites (DF, OF) et soustraites (DF-OF, OF-DF) d'ADNc marquées au P<sup>32</sup>. Les ADNc identifiés comme étant différentiellement exprimés ont été classifiés comme suit : 23 ADNc non redondants qui correspondaient à des séquences dont les fonctions biologiques sont connues; huit ADNc qui correspondaient à des séquences complètes ou partielles dont les fonctions biologiques n'étaient pas connues; trois ADNc qui ne présentaient aucune homologie dans GenBank au moment des analyses. Les gènes ApoER2, CPD, CYP11A, CYP19, FSHr et SERPINE2 ont été identifiés et sont connus comme étant réduits suite à la relâche préovulatoire de LH/hCG chez l'espèce bovine. Pour un groupe de gènes incluant ARFGAP3, CX43, CYP19, FSHr, FST, INHBA, LHr, l'isoforme F du LHr dont l'exon 10 est épissé, PRG1 et RPA2, leurs profils d'expression ont été étudiés par northern virtuel ou RT-PCR à partir de follicules obtenus à différents stades du développement folliculaire et de CL. Les résultats ont confirmé la réduction de l'expression de leurs ARNm dans les GC des OF suivant l'injection d'hCG comparés aux DF. Nous concluons ainsi avoir identifié de

nouveaux gènes réduits ou réprimés par l'hCG durant la période périovulatoire. Ces gènes contribuent possiblement à la croissance folliculaire, à l'ovulation et/ou à la lutéinisation.

Cependant, l'étude des ADNc identifiés lors du criblage de la génothèque soustraite DF-OF devraient être poursuivis et faire l'objet d'une caractérisation approfondie. D'une part, les ADNc correspondant au groupe de gènes dont les séquences et les fonctions sont connues pourraient être utilisées afin de confirmer leurs expressions différentielles par analyse northern ou RT-PCR. Les ADNc dont les séquences sont connues ou inconnues mais sans fonctions biologiquement précises devraient être clonés afin de caractériser les ADNc dans leur ensemble. Les protéines correspondant à ces gènes pourront éventuellement être produites afin de lever des anticorps spécifiques qui permettront d'étudier leurs expressions au cours du développement folliculaire. Ultiment, il s'agira de trouver l'implication de ces protéines dans la croissance et la dominance folliculaires ainsi que l'importance de leur répression dans les follicules au moment de l'ovulation suivant la relâche préovulatoire de la LH/hCG. Une de ces protéines dont la fonction dans la folliculogénèse reste à être déterminée est la protéine sérine/thréonine kinase « *Tribbles homolog 2* » (TRB2) qui a fait l'objet d'une étude plus détaillée (Chapitre 3).

#### **4.2. Caractérisation de TRB2**

L'ADNc de TRB2 fut identifié à sept reprises dans la génothèque soustraite DF-OF suite à son criblage différentiel. Parmi les ADNc qui n'étaient pas connus dans le système reproducteur bovin, c'est celui qui a été retrouvé avec la redondance

la plus élevée justifiant ainsi son clonage et la caractérisation complète de son ADNc. La comparaison de la séquence protéique de TRB2 a démontré la présence d'une protéine homologue chez la vache, récemment caractérisée, et de protéines orthologues chez l'espèce humaine, canine, murine, ainsi que chez la poule et la grenouille. Cette protéine porte le nom de « *Tribbles homolog 2* » (TRB2) et fut initialement nommée *c5fw* chez le chien (Wilkin et al., 1997). La comparaison a démontré que TRB2 est très bien conservée entre ces espèces.

L'expression de TRB2 a été étudiée par analyse northern virtuel en utilisant des DF de la première vague de croissance folliculaire du cycle œstral comparativement aux OF suivant l'injection d'hCG. D'autre part, nous avons analysé l'expression temporelle de TRB2 dans les follicules à différents temps (0, 6, 12, 18, et 23h) après une induction à l'hCG. Une expression moyenne et une forte expression ont été observées respectivement dans les SF et DF alors qu'aucune expression n'était visible dans les OF et le CL. Ces observations soutiendraient l'hypothèse que l'expression de TRB2 serait impliquée dans le développement folliculaire. Parallèlement, chez le chien, il a été observé que TRB2 était significativement stimulé par l'hormone thyroïdo-stimulante dans les follicules thyroïdiens (TSH; Wilkin et al., 1997). Une augmentation tardive (20h) et transitoire de l'ARNm de TRB2 a été notée suivant une stimulation par la TSH (Wilkin et al., 1997). L'ARNm de TRB2 augmentait aussi bien suite à l'activation des voies mitogéniques dépendantes qu'indépendantes de l'AMPc (Wilkin et al., 1997). La TSH est une hormone présentant un arrangement structural semblable à celui de la FSH. Par rapprochement, les effets stimulateurs de la TSH sur l'expression de TRB2 dans les

follicules thyroïdiens du chien soutiendrait l'hypothèse d'une stimulation de l'expression de TRB2 par la FSH dans les GC des follicules ovariens. Par contre, la répression de l'expression de TRB2 dans les OF pourrait contribuer à l'ovulation et/ou à la différenciation des GC en cellules lutéales. L'analyse de l'expression temporelle de TRB2 semble soutenir cette hypothèse puisque l'expression est rapidement réduite suivant l'injection d'hCG comparativement au DF non induit. La LH/hCG pourrait réprimer l'expression de TRB2 en inhibant un signal ou des signaux qui stimulent l'expression de TRB2 dans les GC. De façon alternative, la LH/hCG induirait des répresseurs qui réduiraient sous silence l'expression de TRB2. À ce jour, aucun travail associé à la fonction de TRB2 au cours du développement folliculaire n'est disponible. Ces résultats suggèrent que TRB2 pourrait lier des substrats et préviendrait leur phosphorylation. Il agirait ainsi comme un élément séquestrant et, de ce fait, inhiberait certaines voies de signalisation de la prolifération cellulaire ainsi que celles menant éventuellement à la différenciation des GC en cellules lutéales. Des études supplémentaires permettront de mieux comprendre la fonction et le mécanisme d'action de TRB2 lors de la croissance folliculaire.

### **4.3. Caractérisation de LAPTM4B et de Derlin-1**

#### **4.3.1. Établissement et validation de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa**

En parallèle au projet d'analyse d'expression différentielle des gènes par SSH, une génothèque d'ADNc provenant d'ARNm de GC de DF à J5 du cycle œstral a été utilisée (Brûlé et al., 2000; Lussier et al., 2001). Le repiquage aléatoire d'ADNc suivi de l'analyse des séquences partielles obtenues par séquençage aux extrémités 5' des

ADNc et de la comparaison des séquences dans les banques de données GenBank (NR, EST), avaient démontré la présence d'ADNc dont les séquences n'avaient aucune homologie au moment de l'analyse, soit en juin 2000. À partir de cette génothèque, deux ADNc inconnus ont été choisis de façon aléatoire pour finaliser leurs séquences et étudier leurs expressions dans divers tissus bovins et lors du développement folliculaire et de l'ovulation.

### **4.3.2. Caractérisation de LPTM4B**

#### **4.3.2.1. Caractéristiques et expression de LPTM4B**

Nous avons complété la caractérisation de l'ADNc nommé initialement Gran-5 (numéro d'accès GenBank : NM\_205802) dont le choix était justifié par l'absence d'homologie des séquences dans GenBank au moment des analyses. L'ADNc complet du clone Gran-5 code pour une protéine potentielle de 226 acides aminés ayant un poids moléculaire présomptif de 25.4 kDa. Les analyses dans GenBank ont révélé que le gène correspondant à Gran-5 est situé sur le chromosome humain 8q22.1 et est composé de sept exons séparés par six introns s'étalant sur près de 77 kb. De plus récentes recherches d'homologie sur les acides aminés dans GenBank ont révélé des orthologues de Gran-5 chez différentes espèces correspondant à la protéine « *Lysosomal-Associated Protein Transmembrane-4 beta* » (LPTM4B) d'où la nomenclature du clone Gan-5 modifiée à « *bovine LPTM4B* » (bLPTM4B). La protéine bLPTM4B présente des similarités avec les autres protéines membres de la famille LPTM et sont ainsi nommées du fait de leurs quatre domaines transmembranaires.

Chez les mammifères, trois membres de la famille LPTM ont été caractérisés, soit LPTM4A, LPTM4B et LPTM5. Les protéines LPTM4A et leurs homologues incluant la protéine HUMORF 13 humaine (Nagase et al., 1995) aussi appelée LPTM4 humaine (Cabrita et al., 1999) sont des protéines membranaires couramment identifiées dans les lysosomes et endosomes tardifs (Cabrita et al., 1999; Hogue et al., 1999). Les caractéristiques de la bLPTM4B pourraient suggérer une localisation similaire dans les lysosomes et endosomes tardifs. De plus, les régions C-terminale et N-terminale de la protéine bLPTM4B et de ses orthologues contiennent des motifs riches en proline (P) et caractérisés par le motif PXXP (X étant n'importe quel acide aminé). Plusieurs protéines possédant des domaines riches en proline sont impliquées dans des interactions avec d'autres protéines contenant des domaines SH3 (Ren et al., 1993; Weiler et al., 1996). Ces domaines peuvent être situés n'importe où dans une chaîne peptidique permettant l'interaction de différentes protéines mais sont généralement dénués d'activité catalytique. Les domaines SH3 sont constitués d'environ 60 acides aminés et reconnaissent une région d'environ 10 acides aminés riche en proline située sur une autre protéine présentant le motif PXXP. Il existe deux classes de domaine SH3 selon la position du résidu d'arginine (R) qui peut être situé soit du côté N-terminal (classe 1 : RXXPXXP) soit du côté C-terminal (classe 2 : XPXXPXXR; Feng et al., 1994; Alexandropoulos et al., 1995). L'existence des deux classes est rendue possible par le fait que la structure d'hélice poly-proline adoptée par le peptide riche en proline est pratiquement symétrique et présente au domaine SH3 les chaînes latérales dans une position similaire quelque soit l'orientation du peptide. La protéine bLPTM4B appartiendrait à la classe 1.

L'expression de l'ARNm de bLAPTM4B a été observée dans divers tissus bovins démontrant une expression élevée dans les glandes surrénales, l'ovaire foetal et le foie alors que la plus faible expression fut observée dans la rate. Chez l'espèce humaine, les observations indiquent que l'ARNm et la protéine LAPTM4B étaient très faiblement exprimés dans le foie normal mais surexprimés dans les cellules hépatiques cancéreuses (Liu et al., 2000; Liu et al., 2003; Shao et al., 2003).

L'expression de LAPTM4B dans le foie humain semble ainsi être associée au statut des cellules hépatiques selon qu'elles soient saines ou cancéreuses. Les observations d'expression d'ARNm réalisées chez l'espèce humaine dans le foie contraste avec les résultats que nous avons obtenus chez la vache. L'expression dans le foie chez la vache était élevée tandis qu'elle était faible chez l'espèce humaine. Cette différence pourrait être liée à l'espèce ou aux manipulations techniques ayant généré un résultat et une interprétation différents. L'expression de l'ARNm de LAPTM4B humain était également relativement élevée dans les testicules et le cœur, modérément élevée dans l'ovaire et le rein et très faible dans la rate alors que l'expression la plus faible était observée dans les poumons (Shao et al., 2003). De plus, ces analyses rapportent la présence de deux transcrits de 2.2 kb et de 1.5 kb chez l'espèce humaine alors que nos analyses northern ont révélé la présence d'un seul transcrit à 1.8 kb chez le bovin. Une étude récente a suggéré que le gène LAPTM4B code pour deux isoformes de protéines de poids moléculaires correspondant à 35 kDa et 24 kDa nommées respectivement, LAPTM4B-35 et LAPTM4B-24 (Liu et al., 2004). Les deux isoformes protéiques résulteraient de la présence de deux codons d'initiation de la traduction à partir du transcrit de 2.2 kb (Shao et al., 2003; Liu et al., 2004). Nos observations ont révélé la présence d'un seul codon d'initiation de la traduction dans

la séquence de l'ADNc correspondant au transcrit de LAPTM4B bovin.

L'interprétation des observations obtenues chez l'espèce humaine (Liu et al., 2003; Shao et al., 2003), soit deux transcrits de 2.2 et de 1.5 kb et la présence de deux protéines issues du même ARNm de 2.2 kb nous apparaît étonnante. Toutefois, il faut souligner que la séquence bovine de 186 pb caractérisée en amont de l'ATG dans la région 5' pourrait être traduite car elle ne présente pas de codon stop. Ceci soulève la question à savoir si nous avons caractérisé l'ensemble de l'ADNc correspondant à bLAPTM4B. Afin de répondre à cette question, une analyse de PCR semi-emboîtée effectuée à partir de la génothèque d'ADNc de GC de DF à J5 du cycle œstral a été effectuée telle qu'employée avec succès dans une étude antérieure (Filion et al., 2001). La caractérisation d'un seul clone n'a pas permis d'obtenir plus de séquence en 5' de l'ADNc de bLAPTM4B que nous avons caractérisé. Le criblage d'une librairie d'ADN génomique a, par la suite, permis d'obtenir toute la région 5'-UTR et a révélé la présence d'un seul cadre de lecture ouvert codant pour la protéine de 26.3 kDa. Ce résultat suggère la modification post-traductionnelle de la forme de 26.3 kDa pour donner la forme de 31.5 kDa.

La protéine LAPTM4B-35 humaine renferme 317 acides aminés alors que l'isoforme LAPTM4B-24 en renferme 226. La protéine LAPTM4B bovine que nous avons identifiée correspondrait à l'isoforme de 24 kDa décrite par Liu et al. (2004). Nos analyses western ont révélé que les anticorps levés contre la portion C-terminale de LAPTM4B bovine située après le quatrième domaine transmembranaire (Lys<sup>169</sup>-Ala<sup>226</sup>) reconnaissent les protéines de poids moléculaires 26.3 kDa et 31.5 kDa calculés à la suite de la migration sur un gel dénaturant SDS-PAGE. Ces deux bandes

protéiques semblent correspondre aux bandes de 24 kDa et de 35 kDa chez l'espèce humaine (Liu et al., 2003; Liu et al., 2004). Des analyses western sur des cellules hépatiques humaines cancéreuses à l'aide d'un anticorps levé contre la portion N-terminale de l'isoforme LAPTM4B-35 (premier codon ATG) ne reconnaissait que la forme de 35 kDa alors que l'anticorps levé contre un fragment de l'isoforme LAPTM4B-25 situé entre le troisième et le quatrième domaine transmembranaire reconnaissait les deux formes (Liu et al., 2004). Ces deux résultats obtenus chez l'espèce humaine pourraient soutenir l'existence de deux codons ATG donnant, soit la protéine de 317 acides aminés traduite à partir du premier codon d'initiation de la traduction situé en aval de la région 5'-UTR, soit celle de 226 acides aminés traduite à partir du deuxième codon. La similarité de nos observations obtenues chez l'espèce bovine et celles obtenues chez l'espèce humaine (Shao et al., 2003; Liu et al., 2004) concernant les deux bandes protéiques de poids moléculaires similaires entre les deux espèces soulève la question à savoir si l'ADNc correspondant à bLAPTM4B fut caractérisé dans son ensemble. Afin de répondre à cette question, un criblage d'une génothèque d'ADN génomique bovine devrait être entrepris afin d'obtenir l'ensemble des séquences bovines en amont de celles que nous avons déjà obtenues, soit la région 5'-UTR et la région promotrice. Néanmoins, les résultats obtenus par analyse northern et northern virtuel nous indique clairement la présence d'un seul transcrit chez l'espèce bovine qui correspond à la taille de l'ADNc caractérisé à partir de la génothèque d'ADNc de GC de DF. Une explication alternative aux différentes observations obtenues chez les espèces humaine et bovine serait que bLAPTM4B subirait une modification post-traductionnelle, c'est-à-dire que la protéine de poids moléculaire migrant à 26.3 kDa correspondrait à la protéine traduite à partir du

transcrit de 1.8 kb. Il est à noter que le poids théorique de la protéine de bLAPTM4B calculé à partir des acides aminés déduits de la séquence d'ADNc est de 25.4 kDa. La forme protéique de bLAPTM4B migrant à 31.5 kDa pourrait représenter la forme ayant subi une ou des modifications post-traductionnelles telles des glycosylations, phosphorylations ou couplages lipidiques.

Le développement folliculaire implique la croissance, la division et la différenciation cellulaires ainsi que la survie des tissus. Les orthologues de la protéine bLAPTM4B, membres de la famille LAPTM, ont été associées aux lysosomes et potentiellement impliquées dans la survie cellulaire (Hogue et al., 2002; Liu et al., 2003; Shao et al., 2003). Les lysosomes sont bien connues comme étant des compartiments protéolytiques majeurs renfermant des enzymes variées impliquées dans la destruction de protéines ou autres déchets cellulaires. La protéine LAPTM4A a été observée relativement abondamment dans des membranes enrichies de lysosomes isolés de foie de rat mais son expression endogène était très faible (Cabrita et al., 1999; Hogue et al., 1999). De plus, des analyses d'immunofluorescence ont permis d'associer la protéine LAPTM4A aux lysosomes ou endosomes tardifs (Hogue et al., 1997). Des études fonctionnelles utilisant la levure ont démontré l'implication de la protéine LAPTM4A dans la détoxification de petites molécules lipophyliques (Hogue et al., 1996, 1997). Ces études ont démontré l'habileté de LAPTM4A à contrôler la sensibilité des cellules de levure envers des antibiotiques et des cytotoxines. Par ailleurs, LAPTM4A présente des caractéristiques conservées entre les membres de cette famille de protéines et qui sont retrouvées dans la séquence de la protéine LAPTM4B. Ces observations suggèrent des rôles potentiellement

similaires pour les autres membres de cette famille de protéines transmembranaires. Les résultats que nous avons obtenus par immunohistochimie supporteraient l'hypothèse que les protéines LAPTM4B seraient localisées dans des vésicules péri nucléaires qui correspondraient aux lysosomes et pourraient être impliquées dans la survie des tissus et la prolifération cellulaire. Elles pourraient assurer ces fonctions par leur implication dans la détoxification des cellules et le transport des déchets vers les lysosomes ou endosomes pour y être stockés et dégradés. Dans le développement folliculaire bovin, l'augmentation de l'expression de la protéine LAPTM4B dans les DF et le CL en développement pourrait contribuer respectivement à la prolifération des GC des DF et à la fonction du CL appuyant l'hypothèse de l'implication de la LAPTM4B dans la survie cellulaire.

#### **4.3.2.2. Perspectives**

Nous avons démontré pour la première fois l'expression différentielle de l'ARNm et de la protéine de LAPTM4B lors du développement folliculaire chez la vache . Malgré les résultats générés et la possible implication de LAPTM4B dans la survie des cellules, le mode d'action exact de cette protéine au cours de la folliculogénèse ainsi que les possibilités d'interaction avec d'autres protéines ne sont pas établies. La protéine LAPTM4B présente des motifs PXXP qui pourraient être reconnus par des protéines ayant des domaines SH3 et il serait intéressant de vérifier si elle possède des interactions avec d'autres protéines partenaires. Cette expérience pourrait être réalisée par un marquage métabolique au S<sup>35</sup> de cellules en culture suivi d'une immunoprécipitation à l'aide des anticorps anti-bLAPTM4B, séparation par électrophorèse et analyse autoradiographique. L'avantage d'une telle expérience est

de préciser le poids moléculaire de la protéine d'intérêt (LAPTM4B) et d'indiquer si d'autres protéines se lient à LAPTM4B. Les éventuelles protéines partenaires de LAPTM4B pourraient être identifiées en tentant de les purifier par immunoaffinité en employant les anticorps anti-LAPTM4B fixés de façon covalente sur des billes d'agarose. La protéine LAPTM4B s'y fixerait ainsi que sa ou ses protéines partenaires. Le complexe protéique serait élué puis les protéines séparées sur un gel d'acrylamide. Les bandes protéiques seraient caractérisées par spectrométrie de masse. Toutefois, cette technique ne permet d'identifier que des protéines connues dans les banques de données et non les protéines inconnues. L'approche du double-hybride pourrait également être utilisée afin d'identifier les éventuelles partenaires de LAPTM4B. De plus, en relation avec l'observation que la protéine LAPTM4A serait impliquée dans le processus de détoxification dans les cellules de levure (Hogue et al., 1996, 1997), il serait intéressant de tester cette action en utilisant des cellules de la granulosa en culture ou autres lignées cellulaires. La protéine LAPTM4B pourrait être surexprimée par transfection ou alors son expression inhibée par l'approche d'interférence à l'ARN. Les cellules seraient incubées seules ou en présence de dose croissante de méthotrexate, composé utilisé préalablement dans l'étude d'expression de LAPTM4A chez la levure (Hogue et al., 1996, 1997). Enfin, des analyses d'immunofluorescence et de co-expression de LAPTM4B avec des marqueurs lysosomaux devraient être entreprises afin de vérifier la nature des vésicules associées à LAPTM4B.

### 4.3.3. Caractérisation de Derlin-1

Le deuxième ADNc caractérisé à partir du criblage aléatoire de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa est Gran-17 (Annexe 1). La caractérisation entière de l'ADNc de Gran-17 a démontré un cadre de lecture ouvert codant pour une protéine potentielle de 28.8 kDa possédant quatre passages transmembranaires. Les plus récentes comparaisons des acides aminés de Gran-17 dans la base de données GenBank (NR) ont révélé une identité de 94 % à la protéine humaine « *Degradation in Endoplasmic Reticulum 1* » (Derlin-1; Lilley & Ploegh, 2004; Ye et al., 2004) ainsi que 92 %, 86 % et 82 % d'identité aux protéines de souris, de poule et de grenouille respectivement. Deux autres protéines mammaliennes homologues de la Derlin-1 ont été également caractérisées chez l'espèce humaine et nommées Derlin-2 et Derlin-3 (Lilley & Ploegh, 2004). La protéine Derlin-1 est un facteur important pour l'extraction à partir des réticulum endoplasmiques (RE) mammaliens de certaines protéines qui ont adopté une structure conformationnelle aberrante (Lilley & Ploegh, 2004). La présence dans la protéine Derlin-1 de quatre passages transmembranaires suggère selon certains auteurs des possibilités de création d'un canal de passage de protéines appelées « dislocon » (Lilley & Ploegh, 2004).

La protéine Derlin-1 est une protéine de la membrane du RE essentielle pour la dislocation de deux types de protéines membranaires. Elle dégrade le complexe d'histocompatibilité majeur (MHC) de classe I par l'intermédiaire de la glycoprotéine « *Usher syndrome 11* » (US11) et elle médie la dégradation de la glycoprotéine « *Usher syndrome type 2* » (US2; Lilley & Ploegh, 2004; Ye et al., 2004) initialement

identifiée dans la rétine (Eudy et al., 1998; Huang et al., 2002). Le complexe d'histocompatibilité majeur est un agglomérat antigénique correspondant à un segment du bras court du chromosome 6 et qui code pour plusieurs « *Human leukocyte antigen* ». La protéine US11 est une glycoprotéine du RE de 215 résidus d'acides aminés qui consiste au moins en deux modules avec un domaine luminal qui interagit avec le MHC et un domaine d'interaction avec la protéine Derlin-1 (Lilley & Ploegh, 2004; Ye et al., 2004). Elle cible spécifiquement le MHC de classe I et l'exporte à l'extérieur du RE vers le cytosol (Ye et al., 2004).

La protéine Derlin-1 est une orthologue de la protéine de levure Der-1 dont l'inactivation prévient l'élimination de protéines ayant adopté une structure tridimensionnelle incorrecte dans le RE luminal (Knop et al., 1996; Vashist & Ng, 2004). L'inactivation de la protéine Derlin-1 chez *C. elegans* a résulté en un stress du réticulum endoplasmique (Ye et al., 2004). Les protéines Derlin-1/Der-1 apparaissent être des composants membranaires importants dans la machinerie de rétrotranslocation (Ye et al., 2004). Elles semblent être bien conservées lors de l'évolution et auraient une action de base dans les RE. Il a été montré que Derlin-1 était très largement exprimée avec un fort signal dans plusieurs tissus incluant l'ovaire (Lilley & Ploegh, 2004). Notre étude d'analyse northern a révélé, pour la première fois, que l'ARNm de Derlin-1 bovin était exprimé dans tous les tissus analysés quoiqu'à des taux variables avec la présence de deux transcrits de 2.6 et de 3 kb (voir figure 3, annexe 1). Ce résultat est conforme à l'expression peu variable observée pour la protéine Derlin-1 humaine (Lilley & Ploegh, 2004). Cette expression ubiquitaire de l'ARNm ainsi que le degré de conservation de la protéine

Derlin-1 entre les espèces incluant la levure, suggèrent une fonction essentielle et fondamentale chez la cellule eucaryote. Des études supplémentaires seraient néanmoins nécessaires afin d'étudier le rôle de Derlin-1 au cours de la folliculogenèse chez la vache.

## 5. Conclusion

Le développement des projets de recherche réalisés dans le cadre de cette étude a permis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la croissance folliculaire terminale chez la vache. Les résultats obtenus à l'aide d'un modèle d'étude réalisé *in vivo* ont permis de caractériser des transcrits pertinents pour le développement folliculaire et possiblement associés au processus de la croissance et de la dominance folliculaires.

L'établissement de la génothèque soustraite d'ADNc (DF-OF) par l'approche de la SSH a permis d'identifier des ADNc différenciellement exprimés dans les cellules de la granulosa au cours de la période de dominance folliculaire chez la vache. L'analyse de la génothèque soustraite a permis d'identifier 34 gènes non redondants ayant démontré une expression différentielle dans les cellules de la granulosa. De ces gènes, certains avaient déjà été reconnus comme étant diminués ou réprimés par la relâche préovulatoire de la LH/hCG chez l'espèce bovine dont ApoER2, CPD, CYP11A, CYP19 et SERPINE2. De plus, pour un certain nombre de gènes, nous avons validé leur expression différentielle et démontré leur réduction dans les cellules de la granulosa de follicules ovulatoires induits à l'hCG dont ARFGAP3, CX43, CYP19, FSHr, FST, INHBA, LHr, LHr sans l'exon 10, PRG1, RPA2 et TRB2. Nous avons caractérisé entièrement la séquence de l'ADNc de TRB2 puis démontré que son expression était modulée de façon spatio-temporelle au cours de la période périovulatoire. Ces résultats confirment, pour certains des gènes, leur profil d'expression différentielle et leur implication dans la folliculogenèse et

suggèrent, pour les autres gènes, un rôle potentiel dans le développement folliculaire. D'autre part, de par leur réduction ou leur absence dans le follicule ovulatoire, ces gènes contribueraient possiblement, de façon permissive, à la survenue de l'ovulation et à la mise en place d'un corps jaune fonctionnel. Plus spécifiquement, les résultats obtenus avec TRB2, en plus de ceux déjà rapportés chez la drosophile et le chien, plaident en faveur d'un rôle important de TRB2 dans le contrôle de la division cellulaire. TRB2 agirait potentiellement comme un frein à la prolifération et à la différenciation des cellules de la granulosa lors de la croissance folliculaire.

De plus, les séquences complètes de deux ADNc codant pour les protéines LAPT4B et Derlin-1 ont été caractérisées. Nous avons observé que la protéine LAPT4B était différenciellement exprimée et démontrait une expression la plus élevée dans des tissus en croissance dont les follicules dominants à J5 du cycle œstral. Les fonctions exactes de ces protéines au cours de la folliculogénèse ne sont pas documentées. La protéine LAPT4B partage avec LAPT4A des caractéristiques hautement conservées. Les résultats obtenus avec la LAPT4A en association à son action de détoxification suite à sa surexpression dans les cellules de levure soutiennent l'idée d'un rôle possiblement similaire de LAPT4B dans les cellules de la granulosa. Ainsi, LAPT4B pourrait contribuer à la survie des tissus en développement par son action de détoxification cellulaire. Toutefois, ce rôle biologique de LAPT4B reste à être prouvé.

Cummulativement, ces observations réalisées chez l'espèce bovine a révélé un profil d'expression suggérant un rôle fondamental des gènes identifiés dans la croissance des follicules et lors de leur passage du stade de follicule dominant ou

préovulatoire à celui de follicule ovulatoire. L'intégration future de l'ensemble des résultats obtenus par rapport aux divers stades du développement folliculaire chez la vache aboutira à une meilleure compréhension et maîtrise de la physiologie ovarienne.

## **ANNEXES**

## Annexe 1

### Caractérisation de Derlin-1

Une génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa de follicules dominants bovins à J5 du cycle œstral a été établie dans les phages Lambda (Brûlé et al., 2000). Le repiquage aléatoire de clones d'ADNc à partir de cette génothèque a permis d'identifier un ADNc initialement nommé Gran17 (Lussier et al., 2001). La caractérisation de l'ADNc complet de Gran17 a révélé une séquence de 2617 pb présentant 195 pb dans la région 5'-UTR, un cadre de lecture ouvert de 754 pb et une région 3'-UTR de 1668 pb renfermant deux signaux de polyadénylation suivie d'une queue poly A (Fig. 1). Le cadre de lecture ouvert code pour une protéine potentielle de 251 acides aminés correspondant à un poids moléculaire théorique de 28.8 kDa et un pI de 9.67. Le profil hydrophatique a révélé la présence de quatre passages hydrophobiques potentiellement transmembranaires (Fig. 2). Les analyses des acides aminés de la protéine bovine par la fonction BLAST dans GenBank ont démontré 94 % d'identité à la protéine humaine nommée « *Degradation in the Endoplasmic reticulum 1* » ou Derlin-1 (Lilley & Ploegh, 2004; Ye et al., 2004) ainsi que 92 %, 86 % et 82 % aux protéines de souris (Q99J56), de poule (XP\_418457) et de grenouille (AAH72249), respectivement (Fig. 2). La comparaison de l'expression en ARNm par analyse northern de divers tissus bovins a démontré que Derlin-1 bovin est faiblement exprimé dans tous les tissus étudiés avec une variation de sa concentration en ARNm (Fig. 3). L'analyse northern a révélé la présence de deux transcrits de 3 kb et de 2.6

kb démontrant un niveau d'expression variable mais présent dans tous les tissus analysés. La forme de 3 kb représenterait la forme complète alors que la forme de 2.6 kb pourrait représenter une forme épissée. L'expression variable mais ubiquitaire de l'ARNm de Derlin-1 associée à la très grande conservation des acides aminés de la protéine entre les espèces, suggèrent une action fondamentale de Derlin-1 dans les cellules eucaryotes. Les premières études récentes sur la fonction biologique de Derlin-1 humaine indique qu'elle participerait à l'élimination de protéines contenues dans le réticulum endoplasmique ayant adopté une structure conformationnelle inadéquate (Lilley & Ploegh, 2004; Ye et al., 2004). Cette dégradation serait effectuée par ubiquitination suivie de la destruction dans le protéasome. D'autres études devront être entreprises afin d'élucider la nature des deux transcrits observés chez l'espèce bovine et de bien saisir le rôle de cette protéine nouvellement caractérisée dans les cellules eucaryotes.

**Figure 1. Séquences complètes de l'ADNc de Derlin-1 bovin (numéro d'accès GenBank : NM\_205789) et de la protéine déduite.** L'ADNc codant pour Derlin-1 renferme 2617 pb et consiste en une région 5'-UTR de 195 pb, un cadre de lecture ouvert de 754 pb et une région 3'-UTR de 1668 pb incluant deux signaux de polyadénylation (AATAAA; en gras) suivie de la queue polyA. Les acides aminés sont numérotés à partir de la première méthionine correspondant au codon initiateur de la traduction. La protéine déduite de la séquence d'acides nucléiques renferme 251 acides aminés pour un poids moléculaire de 28.8 kDa et un pI de 9.6. Les astérisques représentent le codon stop.

-195 GGAAGTTTCGCTGCCGAACCTCCCTTGCTGGTCCGAATTCGGTGGCGCCACGTCCGCCG  
 -145 GTCCCCGCCTTCTGCACCGGGGGCTGGGGCGGCTTCCGCCTGGACATTTTCCACTCGCAG  
 -75 AGCAGGCCGCGTCGTGAGGGGGCCGGGACGGGGAGTCGGGCGGCTGTGCGCATCCCGGCC  
 -15 ACCGAAGAGGCGAAGATGTCGGACATCGGGGACTGGTTTAGGAGCATCCCCACCATCACG  
 1 MetSerAspIleGlyAspTrpPheArgSerIleProThrIleThr  
  
 46 CGCTATTGGTTCGCCGCCACTGTCGCGGTCCCCTTAGTCGGTAAACTCGGTCTTATCAGC  
 16 ArgTyrTrpOheAlaAlaThrValAlaValProLeuValGlyLysLeuGlyLeuIleSer  
  
 96 CCGGCCTATTTCTTCCCTCTGGCCCCGAAGCCTTCCCTCTATCGCTTCCAGATTTGGAGGCCA  
 36 ProAlaTyrPhePheLeuTrpProGluAlaPheLeuTyrArgPheGlnIleTrpArgPro  
  
 166 ATCACTGCCACCTTTTACTTCCCTGTGGGTCCAGGCACTGGATTTCTTTATTTGGTCAAT  
 56 IleThrAlaThrPheTyrPheProValGlyProGlyThrGlyPheLeuTyrLeuValAsn  
  
 226 TTATACTTCTTATATCAGTACTCTACTCGACTCGAAACAGGAGCTTTTGATGGGAGGCCA  
 76 LeuTyrPheLeuTyrGlnTyrSerThrArgLeuGluThrGlyAlaPheAspGlyArgPro  
  
 286 GCAGACTATTTATTCATGCTCCTCTTCAACTGGATTTGCATCGTGATTACTGGCTTAGCA  
 96 AlaAspTyrLeuPheMetLeuLeuPheAsnTrpIleCysIleValIleThrGlyLeuAla  
  
 346 ATGGATATGCAGTTGCTGATGATTCTCTGATCATGTCAGTACTTTATGTCTGGGCGCAG  
 116 MetAspMetGlnLeuLeuMetIleProLeuIleMetSerValLeuTyrValTrpAlaGln  
  
 406 CTGAATCGAGACATGATTGTGTCAATTTGGTTTGGAAACACGATTTAAGGCTTGTTATTTA  
 136 LeuAsnArgAspMetIleValSerPheTrpPheGlyThrArgPheLysAlaCysTyrLeu  
  
 466 CCTTGGGTATCCTTGGATTCAACTATATCATTGGAGGCTCGGTCATCAATGAGCTAATT  
 156 ProTrpValIleLeuGlyPheAsnTyrIleIleGlyGlySerValIleAsnGluLeuIle  
  
 526 GGAAATCTTGTCGGACATCTTTATTTCTTCCCTCATGTTTCAAGATACCCGATGGACTTGGGA  
 176 GlyAsnLeuValGlyHisLeuTyrPhePheLeuMetPheArgTyrProMetAspLeuGly  
  
 586 GGGAGGAATTTTCTATCCACACCTCAGTTTTTGTACCGTTGGCTACCCAGCAGGAGAGGA  
 196 GlyArgAsnPheLeuSerThrProGlnPheLeuTyrArgTrpLeuProSerArgArgGly  
  
 646 GGGGTGTCGGGGTTTGGCGTGCCCCAGCTAGCATGAGGCGAGCGGCTGATCAGAACGGC  
 216 GlyValSerGlyPheGlyValProProAlaSerMetArgArgAlaAlaAspGlnAsnGly  
  
 706 GGAGGCGGTTCGACACAACCTGGGGCCAGGGCTTTTCGGCTCGGGGACCAGTGAAGGAGCGGC  
 236 GlyGlyGlyArgHisAsnTrpGlyGlnGlyPheArgLeuGlyAspGln\*\*\*  
  
 766 CTCTGCCTGCCACCAGCCTCTCCACTCAGATGACGTTTTCTCCAGCTCGGGGTGACCT  
 826 TCACCACTGAGTTCTAGCTGATGCTGTTGGATCTGACCCACACTGAATGTAGTCTTTTCCAG  
 886 AACAAGACAACAGTTTTTTAAATCCTGGGGAAAAAAAAAAAAAGTGTTCCTCGAGTTTTCATG  
 946 ATTCTCATTCAAGTCCTTACTGCTAAGAAGAACAATTATCAACTGTGCAAAATTTTCAGAA  
 1006 CTGGCCGTATTACCATTATTATTAGTATTATTTTTGATGTCTTTTTTTTCCCTTTTCCATCT  
 1066 GAGTGATGGGTTTTGGCAGGTCCGACTCTGCCGGCAGCAAGCTGGGTGTCTGGCATTGGG  
 1126 TCACCAGACCCCTGTCCACCGGGCTCTTACCTCTTCCCTCACACACACGTCTCCTTCCCTCC  
 1186 TTTTTCCCTCTCCACATTTCCAGCTAGAGGAGTCTGCCCGTAAAATGGTTCTGCCTCTG  
 1246 ACCAGCTCTTTATTTATTGACCTTTGCCACAGCTTGGCCACAGAGACTTGTTTCACAGCAT  
 1306 TTTGCAGTGGCAGAACCGTAACCTAGGGCAGAAGCCAGAGCAGTGGACGAAGAGCTCCC  
 1366 TCGGCCTTTGGAGTTGCCGTGACCTGCTGTCTGATTTGTCACCGTTTGCCACCTCATCAGCT

1426 ATTTTGATTAAAA**AATAAA**AGCGCCGCTGAGTCAGCGAGGACTCCAGATCGGTATTAAT  
1486 GGGGCACGAGAGGCCCTGCTAGGTGTTCTTTAATCCCAAGTTAAGCGATCAAAACTAGTG  
1546 GGGTTGCACCTTTCATAGGGGTAGGCATCTTGTGTAGGGCGCTGTGTGTACCCAGAGTAG  
1606 TGGGTTTGCATTGTGCTAGAAAAATCCAGCTCACATTGGCCACAGGGAGAAGCTCTTGTG  
1666 GCATCTGGTCATTAATCCTGCTTTTGTCTCATTTGGGTATATGTTTATTGAGTGGAGGG  
1726 GAGAACTTTAAACCCATTTAAGTTGTCTTTTTTTGGGGGGGATAAACCCAGCCCCCATC  
1786 TTCACCCCATGGCCATATGCTTCAGTTAGTTGTGAGGAGGGTGCAGCTCCTTGTATGTA  
1846 GATCTTATTTTCAAGGAGGTGTTATAAGCACATCTAAGTGAATCACGTAATTCGGGTTGTA  
1906 ATGGCTTTTAGACACATCTGTGTTTGAAGGGCTTTTTTATTTTCGAGTCATGAAGGTACATC  
1966 AGACCAACTTCAACACCCACAAGTCTTCCCCCTCCCCCGAAGGTGGGCTTTTTCCA  
2026 TCAGAGCTAGGCTTGTACCAAATAGTTTTTATTTTGAAGGCTATGATGTTTCAGCACAGT  
2086 TTTCTCATTTTATATTTTATTTCTGAAAGTGAAGTGCCTTAGGAGCAGTGTGAGAGGCTG  
2146 CCATACTCCTAGTCAACTAAAAAGTCTCTGGACGTTGGCCGCGTGGTTCTGTATGGAAGC  
2206 ACTGTGCACTCATAGGATGACTCTGAAGCAGTGATGTGTGTTATTTCTAGGAAATGGCGAT  
2266 TTGAAAACATCTCCTCGGTTTTTCATGAGGCTTGTTTGCGTGTACCTCTCCATATTTAATT  
2326 TATATGATAACACAGGAGACGGGGAGAACATGAACCCAGCTGTCACGTGTTCTGCTGTT  
2386 GACCTGTGGCCAC**AATAAA**ATTTACTTGTGAAATTTT

**Figure 2. Comparaison des acides aminés de la protéine Derlin-1 bovine à ses orthologues.** La séquence d'acides aminés a été alignée aux séquences disponibles dans GenBank (humaine : AAH02457; murine : Q99J56; poule : XP\_418457; grenouille : AAH72249). La protéine Derlin-1 présente respectivement 94 %, 92 %, 86 % et 82 % d'identité comparativement aux séquences humaine, murine, de poule et de grenouille. Les quatre régions hydrophobes sont soulignées. Les points représentent les acides aminés identiques tandis que les traits ont été ajoutés pour permettre un meilleur alignement des séquences.

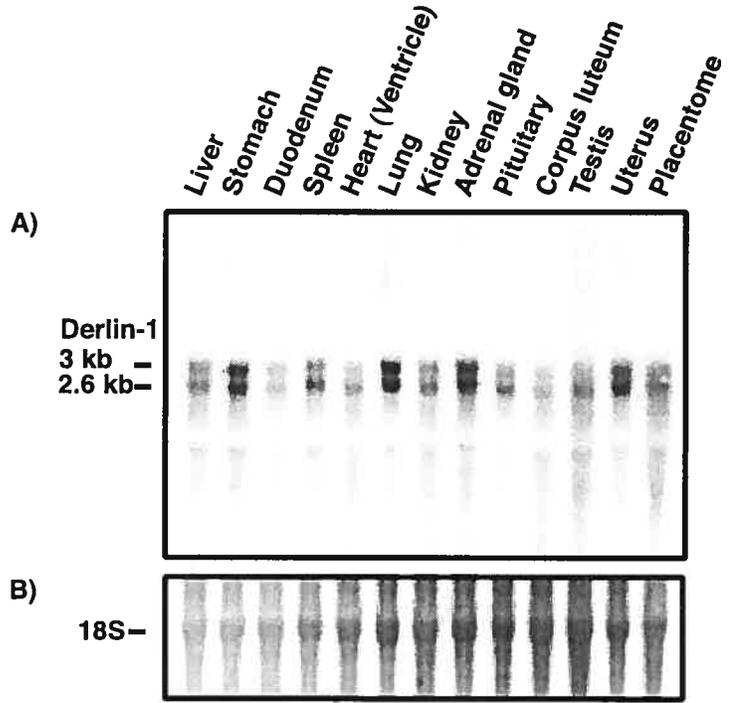
b = *Bos taurus*; h = *Homo sapiens*; m = *Mus musculus*; g = *Gallus gallus*; x = *Xenopus leavis*.

bDerlin-1	1	MSDIGDWFRSIPTITRYWFAATVAVPLVVKLGLISPAYFFLWPEAFLYRF
hDerlin-1	1	.....A.....
mDerlin-1	1	.....A.....I...I.....
gDerlin-1	1	...L.....L.....GSI...I...V.V.L...D..IN..
xDerlin-1	1	...L.....L.....SI.....NAVNLI...N..HK.
bDerlin-1	51	QIWRPITATFYFPVGPSTGFLYLVNLYFLYQYSTRLETGAFDGRPADYLF
hDerlin-1	51	.....
mDerlin-1	51	....F.....A.....
gDerlin-1	51	.....F.....S.....M.
xDerlin-1	51	.....K.....M.....V.
bDerlin-1	101	MLLFNWICIVITGLAMDQLLMIPLIMSVLYVWAQLNRDMIVSFWFGTRF
hDerlin-1	101	.....
mDerlin-1	101	.....L.....
gDerlin-1	101	.....V.....
xDerlin-1	101	.....VI.N.....S.....
bDerlin-1	151	KACYLPWVILGFNYIIGGSVINELIGNLVGHLYFFLMFRYPMDLGGRNFL
hDerlin-1	151	.....
mDerlin-1	151	.....
gDerlin-1	151	.....K.....
xDerlin-1	151	.....F..S...VD.....Y...K.....S..
bDerlin-1	201	STPQFLYRWLPSRRGGVSGFGVPPASMRRAA-DQNGGGRRHNWGQGRFLG
hDerlin-1	201	.....-
mDerlin-1	201	.....-
gDerlin-1	201	.....N.....I.....-E.....
xDerlin-1	201	.....A...ED.....
bDerlin-1	250	DQ
hDerlin-1	250	..
mDerlin-1	250	..
gDerlin-1	250	..
xDerlin-1	251	..

Figure 2

**Figure. 3. Analyse transcriptionnelle de l'ARNm de Derlin-1 par northern.**

L'ARN total a été extrait de divers tissus bovins (20 µg/puits), séparé sur un gel d'agarose de 1 % renfermant de la formaldéhyde, transféré sur des membranes de nylon puis hybridé à l'ADNc complet de Derlin-1 marqué au P<sup>32</sup>. A) L'analyse northern démontre la présence de deux transcrits de 3 kb et de 2.6 kb observés dans tous les tissus analysés sans aucune différence significative. B) L'ARN total (18S) correspondant à chaque échantillon a été coloré au bleu de méthylène.



## Annexe 2

### Caractérisation d'un isoforme du récepteur à la LH

Nous avons analysé l'expression du LHR au cours du développement folliculaire par RT-PCR en utilisant des échantillons de petits follicules (SF), de follicules dominants à J5 du cycle œstral (DF), de follicules ovulatoires 23h suivant l'injection d'hCG (OF) et de corps jaune à J5 (CL) (Figure 4, chapitre 2). Cette analyse a permis de caractériser la séquence du LHR dans laquelle l'exon 10 a été épissé (séquence ci-dessous). De nombreux variants du LHR provenant d'épissage alternatif ont été mis en évidence chez le porc, la souris, le rat et l'espèce humaine (Loosfelt et al., 1989; McFarland et al., 1989; Minegishi et al., 1990; Abdennebi et al., 2002; Madhra et al., 2004). Toutefois, plusieurs des ADNc du LHR isolés à partir de ces espèces codent pour des formes incomplètes dont certaines sont inactives (Bacich et al., 1994). Récemment, on a démontré que l'absence de l'exon 10 diminue la capacité du LHR à transduire l'action de la LH (Muller et al., 2003). Toutefois, le signal de l'hCG n'est pas modifié. La forme que nous avons caractérisée correspondrait à l'isoforme F (LHR-F) qui semble convertir le signal de la LH plus faiblement comparé au récepteur complet. Cette isoforme a déjà été isolée chez la brebis (Bacich et al., 1994) et dans les cellules lutéales chez la vache (Kawate & Okuda, 1998). Bien qu'il ne joue pas de rôle dans la liaison de l'hormone, l'exon 10 est important pour l'activation de la LH par un mécanisme impliquant probablement des changements conformationnels extracellulaires (Muller et al., 2003).

Contrairement au chorionic gonadotropin qui est capable d'activer le LHR-F grâce à son domaine carboxy-terminal, la LH n'active pas efficacement le LHR en absence de l'exon 10 malgré la présence du LHR-F dans le DF et le CL. Ainsi, la fonction biologique de cette isoforme F du LHR pourrait être de réduire la signalisation de la LH dans les GC des DF et le CL en fonction de la variation de l'amplitude et de la pulsativité de la LH circulante.

**Figure 1. Comparaison des séquences d'acides nucléiques et aminés du récepteur complet de la LH (LHr) et de la forme du LHr dont l'exon 10 est épissé (LH-F).** La séquence d'acides nucléiques du LHr de 2435 pb (numéro d'accession GenBank : U20504) a été alignée avec la séquence du LHr sans l'exon 10, de 858 pb (AY651759). Les tirets dans la séquence du LHr-F représentent les séquences manquantes correspondant en totalité à l'exon 10 du LHr. La séquence d'acides aminés est numérotée à gauche à partir de la première méthionine.

LHr AATTCGCGGCCGCGTTCGACCTCCGGGCCATGGGACGGCCGTCCCTCGCGCTGAGGCTGCTG  
 LHr-F  
 1 MetGlyArgProSerLeuAlaLeuArgLeuLeu

LHr CTGGCGCTGCTGCTGCTGCCGCCAGCGCCGTTGCTCTGGGCGCTGCGCCCGGCC  
 LHr-F  
 12 LeuAlaLeuLeuLeuLeuProProProAlaProLeuLeuTrpAlaLeuArgProAlaPro

LHr TGCCAGAGCCCTGCAGCTGCCCCGCCGACGGCGCCCTGCGCTGCCCCGGCCCGCAGGCC  
 LHr-F  
 32 CysProGluProCysSerCysProProAlaGlyAlaLeuArgCysProGlyProGlnAla

LHr GGCTCAGCCGACTATCACTCACCTATCTCCCTATCAAAGTAATCCCATCTCAAGCTTTC  
 LHr-F  
 52 GlyLeuSerArgLeuSerLeuThrTyrLeuProIleLysValIleProSerGlnAlaPhe

LHr AGAGGACTTAATGAGGTCATAAAAATTGAAATCTCTCAGAGTGATCCCTGGAAAAGATA  
 LHr-F  
 72 ArgGlyLeuAsnGluValIleLysIleGluIleSerGlnSerAspSerLeuGluLysIle

LHr GAAGCTAATGCCTTTGACAACCTCCTCAATTTGTCTGAAATACTGATCCAGAACACTAAA  
 LHr-F  
 92 GluAlaAsnAlaPheAspAsnLeuLeuAsnLeuSerGluIleLeuIleGlnAsnThrLys

LHr AACCTGGTGCACATTGAGGCTGGAGCGTTTACAAATCTCCCTCGGTTAAAATACCTAAGC  
 LHr-F  
 112 AsnLeuValHisIleGluAlaGlyAlaPheThrAsnLeuProArgLeuLysTyrLeuSer

LHr ATCTGTAATACAGGCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGAAGATCTTCTCCTCTGAATTT  
 LHr-F  
 132 IleCysAsnThrGlyIleHisLysLeuProAspValThrLysIlePheSerSerGluPhe

LHr AATTTCAATCTGGAAATTTGTGATAACTTACACATAACCACCATACCAAGAAATGCTTTT  
 LHr-F  
 152 AsnPheIleLeuGluIleCysAspAsnLeuHisIleThrThrIleProArgAsnAlaPhe

LHr CAAGGGATGAATAACGAATCCATAACGCTAAAACCTATATGGAAATGGATTTGAAGAAATA  
 LHr-F  
 172 GlnGlyMetAsnAsnGluSerIleThrLeuLysLeuTyrGlyAsnGlyPheGluGluIle

LHr CAAAGTCATGCATTCAATGGGACAACGCTGATTTCCCTGGAGCTGAAGGAAAATGCACGC  
 LHr-F  
 192 GlnSerHisAlaPheAsnGlyThrThrLeuIleSerLeuGluLeuLysGluAsnAlaArg

LHr CTGGAGAAGATGCACAACGACGCCTTCCGGGGGGCCACGGGGCCTAGCATTTTGGATATT  
 LHr-F  
 212 LeuGluLysMetHisAsnAspAlaPheArgGlyAlaThrGlyProSerIleLeuAspIle

LHr TCTTCCACTAAACTGCAGGCCCTGCCTACCTACGGGCTAGAGTCCATTTCAGACACTAATT  
 LHr-F  
 232 SerSerThrLysLeuGlnAlaLeuProThrTyrGlyLeuGluSerIleGlnThrLeuIle

LHr GCCACATCATCTATTCTCTGAAAAAAGCTGCCATCGAGAGAAAAATTTACCAACCTCCTG  
 LHr-F GCCACATCATCTATTCTCTGAAAAAAGCTGCCATCGAGAGAAAAATTTACCAACCTCCTG  
 252 AlaThrSerSerTyrSerLeuLysLysLeuProSerArgGluLysPheThrAsnLeuLeu

LHr GATGCCACACTGACTTACCCCAGCCACTGCTGTGCTTTTAGAAACTTGCCAACAAACGAG  
 LHr-F GATGCCACACTGACTTACCCCAGCCACTGCTGTGCTTTTAGAAACTTGCCAACAAACGAG-  
 272 AspAlaThrLeuThrTyrProSerHisCysCysAlaPheArgAsnLeuProThrAsnGlu

LHr CAAAATTTTTTCATTTTCCATTTTAAAAACTTTTCCAAACAATGTGAAAGCACAGCAAGG  
 LHr-F -----  
 292 GlnAsnPheSerPheSerIlePheLysAsnPheSerLysGlnCysGluSerThrAlaArg

LHr AGACCAAATAATGAAACACTTTATTCTGCCATCTTTGCTGAGAGTGAAGTGAAGTGGCTGG  
 LHr-F -----TTATTCTGCAATCTTTTGGTGAAGTGAAGTGGCTGG  
 312 ArgProAsnAsnGluThrLeuTyrSerAlaIlePheAlaGluSerGluLeuSerGlyTrp

LHr GATTATGACTATGGTTTCTGCTTACCCAAGACACTCCAGTGTGCTCCTGAACCAGATGCT  
 LHr-F GATTATGACTATGGTTTCTGCTTACCCAAGACACTCCAGTGTGCTCCTGAACCAGATGCT  
 332 AspTyrAspTyrGlyPheCysLeuProLysThrLeuGlnCysAlaProGluProAspAla

LHr TTCAATCCCTGTGAAGACATTATGGGCTACAACCTCCTTAGAGTCTGATTTGGCTGATT  
 LHr-F TTCAATCCCTGTGAAGACATTATGGGCTACAACCTCCTTAGAGTCTGATTTGGCTGATT  
 352 PheAsnProCysGluAspIleMetGlyTyrAsnPheLeuArgValLeuIleTrpLeuIle

LHr AATATCCTAGCCATCACGGGAAATGTGACTGTCCTCTTTGTTCTCTGACCAGTCGTTAC  
 LHr-F -----  
 372 AsnIleLeuAlaIleThrGlyAsnValThrValLeuPheValLeuLeuThrSerArgTyr

LHr AACTGACAGTCCCCCGCTTTCTCATGTGCAACCTCTCCTTTGCAGACTTCTGCATGGGG  
 LHr-F -----  
 392 LysLeuThrValProArgPheLeuMetCysAsnLeuSerPheAlaAspPheCysMetGly

LHr CTCTACCTGCTGCTCATGTCCTCAGTCGATGCCAGACCAAAGGCCAGTATTACAACCAT  
 LHr-F -----  
 412 LeuTyrLeuLeuLeuIleAlaSerValAspAlaGlnThrLysGlyGlnTyrTyrAsnHis

LHr GCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGGGTGCAGCGGGCTGGCTTTTTTCACTGTGTTTGCA  
 LHr-F -----  
 432 AlaIleAspTrpGlnThrGlySerGlyCysSerAlaAlaGlyPhePheThrValPheAla

LHr AGTGAACCTCTGTCTACACCCTCACAGTCATCACACTAGAAAGATGGCACACCATCACC  
 LHr-F -----  
 452 SerGluLeuSerValTyrThrLeuThrValIleThrLeuGluArgTrpHisThrIleThr

LHr TATGCTATTCAACTGGACCAAAGCTGCGACTGAAACATGCCATTCCAGTCATGCTCGGA  
 LHr-F -----  
 472 TyrAlaIleGlnLeuAspGlnLysLeuArgLeuLysHisAlaIleProValMetLeuGly

LHr GGATGGCTCTTTTCTACTCTCATTGCCGTGTGCTTCTTGTGGGTGTCAGCAATTACATG  
 LHr-F -----  
 492 GlyTrpLeuPheSerThrLeuIleAlaValLeuProLeuValGlyValSerAsnTyrMet

LHr AAGGTCAGCATTTGCCCTCCCATGGATGTGGAAAGCACTCTCTCACAGGTCTACATCTTA  
 LHr-F  
 512 LysValSerIleCysLeuProMetAspValGluSerThrLeuSerGlnValTyrIleLeu

LHr ACCATCCTGATTCTCAACGTGATGGCCTTCATCATCATTTGTGCTTGCTACATTTAAAT  
 LHr-F  
 532 ThrIleLeuIleLeuAsnValMetAlaPheIleIleIleCysAlaCysTyrIleLysIle

LHr TATTTTGCAGTTCAAATCCAGAGCTGATGGCTACCAACAAAGATACAAAGATTGCTAAG  
 LHr-F  
 552 TyrPheAlaValGlnAspProGluLeuMetAlaThrAsnLysAspThrLysIleAlaLys

LHr AAAATGGCAGTCCTCATCTTCACCGATTCACCTGCATGGCACCAATCTCTTTCTTTGCC  
 LHr-F  
 572 LysMetAlaValLeuIlePheThrAspPheThrCysMetAlaProIleSerPhePheAla

LHr ATCTCAGCTGCCTTCAAAGTGCCCTCATACAGTAACCAACTCAAAGTTCTACTGGTT  
 LHr-F  
 592 IleSerAlaAlaPheLysValProLeuIleThrValThrAsnSerLysValLeuLeuVal

LHr CTCTTTTATCCTGTCAATTCATGCGCCAATCCGTTTCTGTACGCAATTTTCACAAAGGCA  
 LHr-F  
 612 LeuPheTyrProValAsnSerCysAlaAsnProPheLeuTyrAlaIlePheThrLysAla

LHr TTCAAAGGGATTTCTTTCTGTTGCTGAGCAAATTTGGCTGCTGTAAATATCGAGCTGAA  
 LHr-F  
 632 PheGlnArgAspPhePheLeuLeuLeuSerLysPheGlyCysCysLysTyrArgAlaGlu

LHr CTTTATAGGAGGAAGGATTTTTCAGCTTATATCTCCAAGTGCAAAAATGGCTTCACTGGA  
 LHr-F  
 652 LeuTyrArgArgLysAspPheSerAlaTyrIleSerAsnCysLysAsnGlyPheThrGly

LHr TCAAATAAGCCCTCCCGGTCTACCTTCAAGTTGACTACATTACAATGTCAATATTCAGCT  
 LHr-F  
 672 SerAsnLysProSerArgSerThrPheLysLeuThrThrLeuGlnCysGlnTyrSerAla

LHr GTCCTGGACAAGACTTGCTATAAGGAATGTAACTGTGATATCAGTAAACACATTACTG  
 LHr-F  
 692 ValLeuAspLysThrCysTyrLysGluCys\*\*\*

LHr AATTATACTTAAATATGGAAAAAATTTATCTCCACCAGTAATATTAACAAAGAGTTGGT  
 LHr-F  
 LHr TTCAGGAAATTATGTGTTAGGCACATCAGGCAAAAAAGACTCTCTACCTAGCTCAAAATG  
 LHr-F  
 LHr TGGTCCATGACCATGGCCCGTCTAAAAACTATTTGTCAAGAATACTGTTGGTAGCAAGAT  
 LHr-F  
 LHr AGGGATTGCATTGAATCTATAAATTTGCTTTGGGTAGTATACTCATTTCCTACTATATTGAT  
 LHr-F  
 LHr TCTCCAATCCATGAACATGGTATATTTCTCCATC  
 LHr-F

### Annexe 3

#### Caractérisation de la région 5' de LAPTM4B

Une génothèque d'ADN génomique bovine préparée dans des phages Lambda (BD Biosciences Clontech) a été criblée selon le protocole du manufacturier à l'aide de la sonde préparée à partir de l'ADNc complet de LAPTM4B bovine (GenBank NM\_205802). La sonde a été marquée au P<sup>32</sup> par amorces aléatoires (voir chapitre 4, *mRNA expression analysis*). Suite au premier criblage de 1x10<sup>7</sup> pages de lyse, les neuf clones qui ont hybridé à la sonde ont été repiqués et analysés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques définies dans la région 5'-UTR de l'ADNc de LAPTM4B (amorce sens : GCGAGCTCTTCGCGGGGAGAG; amorce anti-sens : CAAGTACCAGACGCCGAGCAG). Un seul clone s'est révélé positif suite à l'analyse par PCR. Un deuxième criblage a été réalisé afin d'isoler le clone positif. À partir du phage purifié, l'ADN recombinant a été produit et purifié (Sambrook & Russel, 2001) puis l'insert a été libéré par digestion à l'aide de l'enzyme BamH1. Les fragments d'ADN libérés ont été insérés dans le vecteur pDrive par une réaction de ligation. Les colonies bactériennes ont été criblées par PCR à l'aide des amorces définies précédemment. L'ADN plasmidique a été isolé à partir des clones positifs puis caractérisé par séquençage. La séquence obtenue (figure 1) démontre la présence d'un seul site d'initiation de la traduction (ATG) et non deux tel que proposé chez l'espèce humaine (Liu et al., 2004). Ce résultat implique l'existence d'un seul ARNm codant pour la protéine de 26.3 kDa qui subirait des modifications post-

traductionnelles résultant en la forme de 31.5 kDa tel que discuté dans la section 4.3.2.

**Figure 1. Caractérisation de la région 5' de LAPTM4B.** Une séquence de 400 pb a été obtenue suite à la caractérisation d'un clone d'ADN génomique correspondant à la région 5'-UTR de l'ADNc de LAPTM4B initialement caractérisé. Le codon ATG représente le site d'initiation de la traduction préalablement caractérisé (GenBank : NM\_205802). Aucun autre codon ATG n'a été observé dans la nouvelle séquence génomique obtenue.

-400 GCGCTGTGGTTGAAGAGTTATGCACGAGTAACTACTGCAGAGTTAGGGAAGCAACTAGGT  
-339 TGTGTGTGTGTGTTTTAATTATGGCAAAGACCTATAGCAAATCTACCATTTTAATCATT  
-278 TTAAGAATTCAGTTCAGTTGAAGTATATTAAGTACATTTAAATTGTTGTGCCAGCAGCCCT  
-217 CGGAGCTCAGGCTCCGGCCGAGGTTCCAGCTGCGAGCTCTTCGCGGGGAGAGGGCGGGGC  
-156 CCGGGCCAGTGGTAGGCAGACGGGGGCCGGGAAGAGGGAGTGAGGGTAGCCGGGGAGAGA  
-95 GGGGCCGGCGACAGCCGCGCGGTGCTCAGGACCGACGGCCAAAGCTCCTGCGAACTTGGGC  
-34 GCAGAGTTGCGCCACTGCGCCCGGGCCCGAGCGATGAAGATG

**MetLysMet**

## 6. Références

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. (1999).** Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 84(8):2744-2750.
- Abdennebi L, Lesport AS, Remy JJ, Grebert D, Pisselet C, Monniaux D, Salesse R. (2002).** Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. *Reproduction* 123(6):819-826.
- Adamski J, Normand T, Leenders F, Monte D, Begue A, Stehelin D, Jungblut PW, de Launoit Y. (1995).** Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem J* 311 ( Pt 2):437-443.
- Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg PH. (1986).** Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(1):179-183.
- Adham IM, Burkhardt E, Benahmed M, Engel W. (1993).** Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 268(35):26668-26672.
- Adra CN, Zhu S, Ko JL, Guillemot JC, Cuervo AM, Kobayashi H, Horiuchi T, Lelias JM, Rowley JD, Lim B. (1996).** LPTM5: a novel lysosomal-associated multispinning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells. *Genomics* 35(2): 328-337.
- Alexandropoulos K, Cheng G, Baltimore D. (1995).** Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8):3110-3114.
- Alibert M, Chimimi G. (2002).** L'élimination des cellules apoptotiques : une phagocytose particulière. *Médecine/Science* 8-9(18) : 853-860.
- Allander SV, Larsson C, Ehrenborg E, Suwanichkul A, Weber G, Morris SL, Bajalica S, Kiefer MC, Luthman H, Powell DR. (1994).** Characterization of the chromosomal gene and promoter for human insulin-like growth factor binding protein-5. *J. Biol Chem* 269: 10891-10898.
- Ameisen JC. (1996).** The origin of programmed cell death. *Science* 272(5266):1278-1279.
- Ameisen JC. (2002).** On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9(4):367-393.
- Antalis TM, Clark MA, Barnes T, Lehrbach P R, Devine PL, Schevzov G, Goss NH, Stephens RW, Tolstoshev P. (1988).** Cloning and expression of a cDNA coding for a human monocyte-derived plasminogen activator inhibitor. *Proc. Nat Acad Sci* 85: 985-989.
- Antonsson B, Martinou JC. (2000).** The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256(1):50-57.

- Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. (1994).** S. S.; Mattei, M.-G.; Olsen, B. R. : Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* 19: 86-90.
- Arishima H, Sato K, Kubota T. (2002).** Immunohistochemical and ultrastructural study of gap junction proteins connexin26 and 43 in human arachnoid villi and meningeal tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(12):1048-1055.
- Armstrong DG, Webb R. (1997).** Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod* 2(3):139-146.
- Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA, Webb R. (1998).** Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 139(4):2146-2154.
- Armstrong DG, Gutierrez CG, Baxter G, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ, Hogg CO, Webb R. (2000).** Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 165(1):101-113.
- Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992).** Beta-arrestin-2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J. Biol Chem* 267: 17882-17890.
- Austin EJ, Mihm M, Evans AC, Knight PG, Ireland JL, Ireland JJ, Roche JF. (2001).** Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 64(3):839-848.
- Avraham S, Stevens RL, Nicodemus CF, Gartner MC, Austen KF, Weis JH. (1989).** Molecular cloning of a cDNA that encodes the peptide core of a mouse mast cell secretory granule proteoglycan and comparison with the analogous rat and human cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(10):3763-3767
- Bacich DJ, Rohan RM, Norman RJ, Rodgers RJ. (1994).** Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. *Endocrinology* 135(2):735-744.
- Bain PA, Meisler MH, Taylor BA, Payne AH. (1993).** The genes encoding gonadal and nongonadal forms of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase are closely linked on mouse chromosome 3. *Genomics* 16(1):219-223.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A. (1996).** Effects of an *Igf1* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10(7):903-918.
- Baker TG, Neal P. (1974).** Oogenesis in human fetal ovaries maintained in organ culture. *J Anat* 117(Pt 3):591-604.
- Bao B, Calder MD, Xie S, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS, Garverick HA. (1998).** Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biol Reprod* 59(4):953-959.

- Bao B, Garverick HA. (1998).** Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 76(7):1903-1921.
- Bédard J, Brûlé S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG. (2003).** Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 64(2):152-165.
- Bedell MA, Cleveland LS, O'Sullivan TN, Copeland NG, Jenkins NA. (1996).** Deletion and interallelic complementation analysis of Steel mutant mice. *Genetics* 142(3):935-944.
- Beers WH. (1975).** Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 6(3):379-386.
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. (2001).** Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 64(2):432-441.
- Behrman HR. (1979).** Prostaglandins in hypothalamo-pituitary and ovarian function. *Annu Rev Physiol* 41:685-700.
- Bellin ME, Lenz RW, Steadman LE, Ax RL. (1983).** Proteoglycan production by bovine granulosa cells in vitro occurs in response to fsh. *Mol Cell Endocrinol* 29(1):51-65.
- Benoit AM, Inskoop EK, Dailey RA. (1992).** Effect of a nonsteroidal aromatase inhibitor on in vitro and in vivo secretion of estradiol and on the estrous cycle in ewes. *Domest Anim Endocrinol* 9(4):313-327.
- Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. (2000).** Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 167(3):371-382.
- Bernard MP, Myers RV, Moyle WR. (1990).** Cloning of rat lutropin (LH) receptor analogs lacking the soybean lectin domain. *Mol Cell Endocrinol* 71(3):R19-23.
- Bérubé D, Luu The V, Lachance Y, Gagné R, Labrie F. (1989).** Assignment of the human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSD3B) to the p13 band of chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 52(3-4):199-200.
- Bigay J, Gounon P, Robineau S, Antonny B. (2003).** Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* 426(6966):563-566.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. (1993).** Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133(5):2204-2212.
- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. (1996).** Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*. 2(2):103-117.
- Binz SK, Lao Y, Lowry DF, Wold MS. (2003).** The phosphorylation domain of the 32-kDa subunit of replication protein A (RPA) modulates RPA-DNA interactions. Evidence for an intersubunit interaction. *J Biol Chem* 278(37):35584-35591.
- Blanchette F, Day R, Dong W, Laprise MH, Dubois CM. (1997).** TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest* 99(8):1974-1983.

- Blatt C, Eversole-Cire P, Cohn VH, Zollman S, Fournier REK, Mohandas LT, Nesbitt M, Lugo T, Jones DT, Reed RR, Weiner LP, Sparkes RS, Simon MI (1988).** Chromosomal localization of genes encoding guanine nucleotide-binding protein subunits in mouse and human. *Proc Nat Acad Sci* 85: 7642-7646.
- Bobe J, Goetz FW. (2001).** A novel osteopontin-like protein is expressed in the trout ovary during ovulation. *FEBS Lett* 489(2-3):119-124.
- Bodensteiner KJ, McNatty KP, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. (2000).** Expression of growth and differentiation factor-9 in the ovaries of fetal sheep homozygous or heterozygous for the inverdale prolificacy gene (FecX(I)). *Biol Reprod* 62(6):1479-1485.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. (1996).** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815.
- Bossy-Wetzel E, Green DR. (1999).** Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem* 274(25):17484-90.
- Botta M, Manetti F, Corelli F. (2000).** Fibroblast growth factors and their inhibitors. *Curr Pharm Des* 6(18):1897-1924.
- Braw-Tal R. (1994).** Expression of mRNA for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. *J Mol Endocrinol* 13(3):253-64.
- Brenkman AB, Burgering BM. (2003).** FoxO3a eggs on fertility and aging. *Trends Mol Med* 9(11): 464-467.
- Bridges PJ, Fortune JE. (2003).** Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 25(2):199-214.
- Brinkman A, Groffen C, Kortleve DJ, Geurts van Kessel A, Drop SLS. (1988).** Isolation and characterization of a cDNA encoding the low molecular weight insulin-like growth factor binding protein (IBP-1). *EMBO J* 7: 2417-2423.
- Brissenden JE, Derynck R, Francke U. (1985a).** Mapping of transforming growth factor alpha gene on human chromosome 2 close to the breakpoint of the Burkitt's lymphoma t(2;8) variant translocation. *Cancer Res* 45(11 Pt 2):5593-5597.
- Brissenden JE, Derynck R, Francke U. (1985b).** Transforming growth factor alpha gene (TGFA) maps to human chromosome 2 close to the breakpoint of the t(2;8) variant translocation in Burkitt lymphoma. *Cytogenet Cell Genet* 40: 589.
- Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. (1984).** Chromosomal mapping of loci for insulin-like growth factors I and II and for epidermal growth factor in man. (Abstract) *Am. J Hum Genet* 36: 133S.
- Britt KL, Findlay JK. (2002).** Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol* 175(2):269-276.
- Brower PT, Schultz RM. (1982).** Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev Biol* 90(1):144-153.
- Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. (1980).** Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207: 373-378.
- Brûlé S, Rabahi F, Faure R, Beckers JF, Silversides DW, Lussier JG. (2000).** Vacuolar system-associated protein-60: a protein characterized from bovine

granulosa and luteal cells that is associated with intracellular vesicles and related to human 80K-H and murine beta-glucosidase II. *Biol Reprod* 62(3):642-654.

- Burger HG, Igarashi M, Baird D, Mason T, Bardin W, McLachlan R, Chappel S, Miyamoto K, de Jong F, Moudgal A, Demoulin A, Nieschlag E, de Kretser D, Robertson D, Findlay J, Sasamoto S, Forage R, Schwartz N, Fukuda M, Steinberger A, Hasegawa Y, Tanabe K, Ling N, Ying S-Y. (1988).** Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. (Letter) *J. Clin Endocr Metab* 66: 885-886.
- Burkhardt E, Adham IM, Hobohm U, Murphy D, Sander C, Engel W. (1994).** A human cDNA coding for the Leydig insulin-like peptide (Ley I-L). *Hum Genet* 94(1):91-94.
- Butler WR, Katz LS, Arriola J, Milvae RA, Foote RH. (1983).** On the negative feedback regulation of gonadotropins in castrate and intact cattle with comparison of two FSH radioimmunoassays. *J Anim Sci.* 56(4):919-929.
- Cabrita MA, Hobman TC, Hogue DL, King KM, Cass CE. (1999).** Mouse transporter protein, a membrane protein that regulates cellular multidrug resistance, is localized to lysosomes. *Cancer Res* 59(19): 4890-4897.
- Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA, (2001).** Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 4, 5 isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol Reprod* 65: 471-476.
- Camaioni A, Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. (1996).** Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Arch Biochem Biophys* 325(2):190-198.
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. (1995).** Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl.* 49:335-450.
- Carpenter G, Cohen S. (1979).** Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 48:193-216.
- Carulli JP, Artinger M, Swain PM, Root CD, Chee L, Tulig C, Guerin J, Osborne M, Stein G, Lian J, Lomedico PT. (1998).** High throughput analysis of differential gene expression. *Cell Biochem Suppl* 30-31:286-296.
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. (2003).** Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301(5630): 215-218.
- Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, et al. (1986).** Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45(5):685-698.
- Cavenagh MM, Whitney JA, Carroll K, Zhang C, Boman AL, Rosenwald AG, Mellman I, Kahn RA (1996).** Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. *J Biol Chem* 271: 21767-21774.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K, Black**

- RA. (1992).** Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256(5053):97-100.
- Chaffin CL, Stouffer RL. (2000).** Role of gonadotrophins and progesterone in the regulation of morphological remodelling and atresia in the monkey peri-ovulatory follicle. *Hum Reprod* 15(12):2489-2495.
- Chase CC Jr, Kirby CJ, Hammond AC, Olson TA, Lucy MC. (1998).** Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *J Anim Sci* 76(1):212-219.
- Chauhan SS, Popescu NC, Ray D, Fleischmann R, Gottesman MM, Troen BR. (1993).** Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. *J Biol Chem* 268(2):1039-1045.
- Chen CC, Johnson PA. (1996).** Expression of inhibin alpha and inhibin/activin beta A subunits in the granulosa layer of the large preovulatory follicles of the hen. *Biol Reprod* 55(2):450-454.
- Chen L, Mao SJ, Larsen WJ. (1992).** Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. A role for a member of the inter-alpha-trypsin inhibitor family. *J Biol Chem* 267(17):12380-12386.
- Chen S, Shively JE, Nakajin S, Shinoda M, Hall PF. (1986).** Amino terminal sequence analysis of human placenta aromatase. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 713-719.
- Cherqui S, Kalatzis V, Trugnan G, Antignac C. (2001).** The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem* 276(16): 13314-13321.
- Chesnel F, Wigglesworth K, Eppig JJ. (1994).** Acquisition of meiotic competence by denuded mouse oocytes: participation of somatic-cell product(s) and cAMP. *Dev Biol* 161(1):285-295.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. (1995).** FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512.
- Chun SY, Popliker M, Reich R, Tsafirri A. (1992).** Localization of preovulatory expression of plasminogen activator inhibitor type-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase type-1 mRNAs in the rat ovary. *Biol Reprod* 47(2):245-253.
- Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafirri A, Hsueh AJ. (1994).** Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135(5):1845-1853.
- Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJ. (1995).** Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology* 136(7):3120-3127.
- Chung BC, Matteson KJ, Voutilainen R, Mohandas TK, Miller WL. (1986).** Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450<sub>scc</sub>: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(23):8962-8966.
- Cohen S. (1962).** Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562.

- Conti M. (2002).** Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biol Reprod* 67(6):1653-1661.
- Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. (2003).** Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem* 278(8):5493-5496.
- Corbin CJ, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JI, Mendelson CR, Simpson ER. (1988).** Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc Natl Acad Sci* 85: 8948-8952.
- Coroneos EJ, Kester M, Maclouf J, Thomas P, Dunn MJ. (1997).** Calcium-regulated protein tyrosine phosphorylation is required for endothelin-1 to induce prostaglandin endoperoxide synthase-2 mRNA expression and protein synthesis in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 8(7):1080-1090.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. (1999).** Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286(5448):2328-2331.
- Couse JF, Korach KS. (1999).** Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol (Paris)*. 60(2):143-148
- Couse JF, Korach KS. (2001).** Contrasting phenotypes in reproductive tissues of female estrogen receptor null mice. *Ann N Y Acad Sci*. 948:1-8
- Couzinet A, Herincs Z, Hueber A-O. (2002).** Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Médecine/Science* 8-9(18) : 841-852.
- Crompton M. (2000).** Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 12(4):414-419.
- Cunningham MA, Zhu Q, Unterman TG, Hammond JM. (2003).** Follicle-stimulating hormone promotes nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FoxO1a via phosphatidylinositol 3-kinase in porcine granulosa cells. *Endocrinology* 144(12):5585-5494.
- Dean J. (1992).** Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest* 89: 1055-1059
- Dekel N. (1996).** Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev Reprod* 1(2):82-88.
- De La Fuente R, Eppig JJ. (2001).** Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol* 229(1):224-236.
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. (1985).** Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316(6030):701-705.
- Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV. (1984).** Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* 38(1):287-297.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. (1996).** Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially

regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12):6025-6030.

- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. (1999).** Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303:349-380.
- Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. (2002).** Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha production in the CL. *Mol Cell Endocrinol* 191(1):65-80.
- Dieleman SJ, Kruip TA, Fontijne P, de Jong WH, van der Weyden GC. (1983).** Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol* 97(1):31-42.
- Docherty AJP, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJR. (1985).** Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318: 66-69.
- Donadeu FX, Ginther OJ. (2003).** Suppression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. *Theriogenology* 60(8):1423-1434.
- Dow MP, Bakke LJ, Cassar CA, Peters MW, Pursley JR, Smith GW. (2002).** Gonadotrophin surge-induced upregulation of mRNA for plasminogen activator inhibitors 1 and 2 within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Reproduction*. 123(5):711-719.
- Driancourt M-A., Royère D., Hédon B., Levasseur M-C. (1991a).** Cycles oestriens et cycles menstruels. In *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. C. Thibault, M-C Levasseur (Eds) Ellipses INRA. pp 573-587.
- Driancourt M-A., Gougeon A., Royère D., Hédon B., Thibault C. (1991b).** La fonction ovarienne. In *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. C. Thibault, M-C Levasseur (Eds) Ellipses INRA. pp 272-298.
- Driancourt M-A., Gougeon A. (1999).** Folliculogénèse. In *Ovocyte et Embryon : De la physiologie à la pathologie*. Hamamah S., Ménézo Y. (Eds) Ellipses. pp 6-22.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. (2000).** Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 5(3):143-152.
- Driancourt MA. (2001).** Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55(6):1211-39.
- Driancourt MA, Reynaud K, Smitz J. (2001).** Differences in follicular function of 3-month-old calves and mature cows. *Reproduction* 121(3):463-474.
- D'Souza-Schorey C, Li G, Colombo MI, Stahl PD. (1995).** A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* 267: 1175-1178.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. (1998).** The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12(12):1809-1817.
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. (1995).** Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270(18):10618-10624.

- Duffy DM, Stouffer RL (2001).** The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. *Mol Hum Reprod* 7(8):731-739.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. (2000).** Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127(19):4277-4291.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. (1999).** Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140(12):5789-5796.
- Eckhart L, Henry M, Santos-Beneit AM, Schmitz I, Krueger A, Fischer H, Bach J, Ban J, Kirchhoff S, Krammer PH, Mollinedo F, Tschachler E. (2001).** Alternative splicing of caspase-8 mRNA during differentiation of human leukocytes. *Biochem Biophys. Res Commun* 289: 777-781.
- Einspanier A, Zarreh-Hoshiyari-Khah MR, Balvers M, Kerr L, Fuhrmann K, Ivell R. (1997).** Local relaxin biosynthesis in the ovary and uterus through the oestrous cycle and early pregnancy in the female marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Hum Reprod* 12(6):1325-1337.
- Eisenhauer KM, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. (1995).** Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod* 53(1):13-20.
- Elvin JA, Matzuk MM. (1998).** Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod* 3(3):183-195.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. (1999).** Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13(6):1035-1048.
- Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. (2000).** Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 159(1-2):1-5.
- Endege WO, Steinmann KE, Boardman LA, Thibodeau SN, Schlegel R. (1999).** Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 26(3):542-548.
- Enuyer M. (2000).** Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction. *Point vétérinaire* 31(209): 377-383.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL. (1985).** Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod* 33(5):1041-1049.
- Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K. (1996).** Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol Reprod Dev* 44(2):260-273.
- Eppig JJ. (2001).** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122(6):829-838.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. (2002).** The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2890-2894.
- Erdile LF, Wold MS, Kelly TJ. (1990).** The primary structure of the 32-kDa subunit of human replication protein A. *J Biol Chem* 265(6):3177-3182.
- Erdile LF, Heyer WD, Kolodner R, Kelly TJ. (1991).** Characterization of a cDNA encoding the 70-kDa single-stranded DNA-binding subunit of human

replication protein A and the role of the protein in DNA replication. *J Biol Chem* 266(18):12090-12098.

- Erickson GF, Shimasaki S. (2000).** The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 11(5):193-198.
- Erickson GF, Shimasaki S. (2001).** The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 76(5):943-949.
- Espey LL, Yoshioka S, Russell DL, Robker RL, Fujii S, Richards JS. (2000).** Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. *Biol Reprod* 62(4):1090-1095.
- Espey LL. (1994).** Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 50(2):233-238.
- Ethier JF, Findlay JK. (2001).** Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction* 121(5):667-675.
- Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, Yan D, Ahmad I, Cheng JJ, Ayuso C, Cremers C, Davenport S, Moller C, Talmadge CB, Beisel KW, Tamayo M, Morton CC, Swaroop A, Kimberling WJ, Sumegi J. (1998).** Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* 280: 1753-1757
- Evain-Brion D. (1994).** [Growth factors: a pluripotent and misnamed family] *Contracept Fertil Sex* 22(9):523-527.
- Evans CT, Ledesma DB, Schulz TZ, Simpson ER, Mendelson CR. (1986).** Isolation and characterization of a complementary DNA specific for human aromatase-system cytochrome P-450 mRNA. *Proc Nat Acad Sci* 83: 6387-6391.
- Evans AC, Fortune JE. (1997).** Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138(7):2963-2971.
- Evans AC, Ireland JL, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ. (2004).** Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod* 70(5):1475-1484.
- Fair T, Crozet N. (1999).** Ovogenèse et croissance ovulatoire. In *Ovocyte et Embryon : De la physiologie à la pathologie*. Hamamah S., Ménézo Y. (Eds) Ellipses. pp 24-35.
- Fayad T, Levesque V, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. (2004).** Gene Expression Profiling of Differentially Expressed Genes in Granulosa Cells of Bovine Dominant Follicles Using Suppression Subtractive Hybridization. *Biol Reprod* 70 : 523-533
- Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL. (1994).** Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266(5188):1241-1247.
- Ferguson CA, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT. (1998).** Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev* 1998 12(16):2636-2649.

- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. (1996).** In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Nat Acad Sci* 93: 7464-7469.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri E. S. (1994).** CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Biol Chem* 269: 30761-30764.
- Fesik SW, Shi Y. (2001).** Structural biology. Controlling the caspases. *Science* 294(5546):1477-1478.
- Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. (2002).** Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 191(1):35-43.
- Fisher RP, Morgan DO. (1994).** A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78: 713-724.
- Fletcher WH, Greenan JR. (1985).** Receptor mediated action without receptor occupancy. *Endocrinology* 116(4):1660-1662.
- Flier JS., Usher P, Moses AC. (1986).** Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor (IGF-I) receptor blocks IGF-I receptor-mediated DNA synthesis: clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and insulin in human skin fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci* 83: 664-668.
- Fortune JE. (1986).** Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod* 35(2):292-299.
- Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. (2000).** The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2):53-60.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. (2001).** Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod.* 65(3):648-54.
- Fortune JE. (1994).** Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50(2):225-232.
- Fortune JE. (2003).** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 78(3-4): 135-163.
- Fowkes RC, Burrin JM. (2003).** Steroidogenic factor-1: a key regulator of gonadotroph gene expression. *J Endocrinol* 177(3):345-350.
- Franchimont P, Hazee-Hagelstein MT, Hazout A, Gysen P, Salat-Baroux J, Schatz B, Demerle F. (1990).** Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. III. Proteoglycans. *Biol Reprod.* 43(2):183-190.
- Franz O, Bruchhaus I I, Roeder T. (1999).** Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res* 27(11):e3.
- Frigeri C, Tsao J, Czerwinski W, Schimmer BP. (2000).** Impaired steroidogenic factor 1 (NR5A1) activity in mutant Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Mol Endocrinol* 14(4):535-544.
- Fulop C, Kamath RV, Li Y, Otto JM, Salustri A, Olsen BR, Glant TT, Hascall VC. (1997).** Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal

localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene* 202(1-2):95-102.

- Gal S, Gottesman MM. (1988).** Isolation and sequence of a cDNA for human pro-(cathepsin L). *Biochem J* 253(1):303-306.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. (2000).** Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25(3):279-283.
- Garrido C, Saule S, Gospodarowicz D. (1993).** Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors* 8(2):109-117.
- Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S. (1994).** Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 7(1):34-39.
- Gharani N, Waterworth DM, Batty S, White D, Gilling-Smith C, Conway GS, McCarthy M, Franks S, Williamson R. (1997).** Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Molec Genet* 6: 397-402
- Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, Dano K, Lebo RV, Gelehrter TD. (1986).** cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest* 78: 1673-1680.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. (2001).** Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 65(3):638-647.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. (1989).** Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 87(1):223-230.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. (1996).** Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55(6):1187-1194.
- Ginther OJ, Meira C, Beg MA, Bergfelt DR. (2002).** Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. *Biol Reprod* 67(3):862-867.
- Gittens JE, Mhawi AA, Lidington D, Ouellette Y, Kidder GM. (2003).** Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(4):C880-887.
- Glister C, Kemp CF, Knight PG. (2004).** Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127(2):239-254.
- Goldfarb M. (1996).** Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev* 7(4):311-325.
- Gomes XV, Wold MS. (1996).** Functional domains of the 70-kilodalton subunit of human replication protein A. *Biochemistry* 35(32):10558-10568.

- Gong JG, Bramley T, Webb R. (1991).** The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 45(6):941-949.
- Gong JG, Bramley TA, Webb R. (1993).** The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod Fert* 97 : 247-254.
- Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R. (1996).** Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 55(1):68-74.
- Gong JG, Baxter G, Bramley TA, Webb R. (1997).** Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J Reprod Fertil* 110(1):91-97.
- Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS. (2000).** Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14(8):1283-1300.
- Goodman AL, Hodgen GD. (1983).** The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 39:1-73.
- Gougeon A, Testart J. (1990).** Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 54(5):848-52.
- Gougeon A. (1986).** Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1(2):81-87.
- Gougeon A, Lefevre B, Testart J. (1992).** Influence of a gonadotrophin-releasing hormone agonist and gonadotrophins on morphometric characteristics of the population of small ovarian follicles in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 95(2):567-575.
- Gougeon A. (1994).** [Intragonadal regulation of human follicular genesis: facts and hypotheses] *Ann Endocrinol (Paris)*. 55(2):63-73.
- Gougeon A, Busso D. (2000).** Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2):33-42.
- Gough NR, Zweifel ME, Martinez-Augustin O, Aguilar RC, Bonifacino JS, Fambrough DM. (1999).** Utilization of the indirect lysosome targeting pathway by lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) is influenced largely by the C-terminal residue of their GYXXphi targeting signals. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23):4257-4269.
- Granot I, Dekel N. (1998).** Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: developmental and hormonal regulation of the expression of connexin43. *Hum Reprod.* 13 Suppl 4:85-97.
- Granot I, Dekel N. (2002).** The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins. *Trends Endocrinol Metab* 13(7):310-313.
- Gras S, Hannibal J, Fahrenkrug J. (1999).** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an auto/paracrine stimulator of acute progesterone

accumulation and subsequent luteinization in cultured periovulatory granulosa/lutein cells. *Endocrinology* 140(5):2199-2205.

- Gray A, Dull TJ, Ullrich A. (1983).** Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* 303(5919):722-725.
- Gray PW, Barrett K, Chantry D, Turner M, Feldmann M. (1990).** Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein. *Proc Nat Acad Sci* 87: 7380-7384.
- Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Bilski JJ, Jablonka-Shariff A, Doraiswamy V, Reynolds LP. (1998).** Gap junctional proteins, connexin 26, 32, and 43 in sheep ovaries throughout the estrous cycle. *Endocrine* 8(3):269-279.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. (1986).** Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231: 1150-1154.
- Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. (1996).** Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol Chem* 271: 30375-30380.
- Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, Wu Lee YH, Durkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A. (1999).** Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J* 18(11):3034-3043.
- Grimek HJ, Bellin ME, Ax RL. (1984).** Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 30(2):397-409.
- Griswold MD, Heckert L, Linder C. (1995).** The molecular biology of the FSH receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6):215-218.
- Gromoll J, Wistuba J, Terwort N, Godmann M, Muller T, Simoni M. (2003).** A new subclass of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor lacking exon 10 messenger RNA in the New World monkey (*Platyrrhini*) lineage. *Biol Reprod.* 69(1):75-80.
- Guilbault LA, Rouillier P, Matton P, Glencross RG, Beard AJ, Knight PG. (1993).** Relationships between the level of atresia and inhibin cotents (alpha subunit and alpha-beta dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biol Reprod* 48(2): 268-276.
- Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo FJ, Matzuk MM. (1998).** Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 12(1):96-106.
- Gurates B, Sebastian S, Yang S, Zhou J, Tamura M, Fang Z, Suzuki T, Sasano H, Bulun SE. (2002).** WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep;87(9):4369-77.
- Gurates B, Amsterdam A, Tamura M, Yang S, Zhou J, Fang Z, Amin S, Sebastian S, Bulun SE. (2003).** WT1 and DAX-1 regulate SF-1-mediated human P450arom gene expression in gonadal cells. *Mol Cell Endocrinol* 208(1-2):61-75.

- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. (2000).** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod* 62(5):1322-1328.
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. (1991).** Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(21):9618-9622.
- Hahn C, Hirsch B, Jahnke D, Durkop H, Stein H. (1999).** Three new types of Apaf-1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 746-749.
- Hansel W, Alila HW, Dowd JP, Yang XZ. (1987).** Control of steroidogenesis in small and large bovine luteal cells. *Aust J Biol Sci* 40(3):331-347.
- Hansson V, Skalhegg BS, Tasken K. (2000).** Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73(1-2):81-92.
- Hardy K. (1999).** Apoptosis in the human embryo. *Rev Reprod* 4(3):125-134.
- Harper KM, Brackett BG. (1993).** Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod* 48(2):409-416.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. (1988).** Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun* 156(2):668-674.
- Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ. (1999).** Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140(3):1236-1244.
- He J, Shao G, Zhou R. (2003).** Effects of the novel gene, LAPTM4B, highly expression in hepatocellular carcinoma on cell proliferation and tumorigenesis of NIH3T3 cells. *Beijing Da Xue Xue Bao* 35(4):348-352.
- Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. (1984).** Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308(5955):149-153.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. (1997).** TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390(6659):465-471.
- Hengartner MO. (2000).** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-776.
- Hengartner MO. (2001).** Apoptosis. DNA destroyers. *Nature* 412(6842):27, 29.
- Hennebold JD. (2004).** Characterization of the ovarian transcriptome through the use of differential analysis of gene expression methodologies. *Hum Reprod Update* 10(3):227-239.
- Henneke G, Koundrioukoff S, Hubscher U. (2003).** Multiple roles for kinases in DNA replication. *EMBO Rep* 4(3):252-256.
- Herlands RL, Schultz RM. (1984).** Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *J Exp Zool* 229(2):317-325.
- Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkin G, Horvitz HR. (1988).** The POU domain: a large conserved region in the mammalian Pit-1, oct-1, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev* 2: 1513-1516.

- Hess KA, Chen L, Larsen WJ. (1999).** Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biol Reprod* 61(2):436-443.
- Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. (1997).** AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood* 90: 3714-3719
- Hinshelwood MM, Corbin CJ, Tsang PC, Simpson ER. (1993).** Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 133(5):1971-1977.
- Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, Kishi H, Ibuki Y, Miyamoto K. (1999).** A role of insulin-like growth factor I in luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells. *Endocrinology* 140(11):4965-4971.
- Hla T, Neilson K. (1992).** Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16):7384-7388.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. (1990).** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336.
- Hogue DL, Ellison MJ, Young JD, Cass CE. (1996).** Identification of a novel membrane transporter associated with intracellular membranes by phenotypic complementation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271(16): 9801-9808.
- Hogue DL, Ellison MJ, Vickers M, Cass CE. (1997).** Functional complementation of a membrane transport deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by recombinant ND4 fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 238(3):811-816.
- Hogue DL, Kerby L, Ling V. (1999).** A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274(18): 12877-12882.
- Hogue DL, Nash C, Ling V, Hobman TC. (2002).** Lysosome-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4 alpha) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem J* 365(Pt 3): 721-730.
- Honing S, Sandoval IV, von Figura K. (1998).** A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* 17(5): 1304-1314.
- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, Shimizu M, Onda H, Oshimura M, Arimura A, Fujino M. (1992).** Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta* 1129: 199-206.
- Houde A, Lussier JG, Ethier JF, Gagnon C, Silversides DW. (1994).** Cloning and tissue expression of bovine follistatin cDNA. *Mol Reprod Dev* 37(4):391-397.
- Hossner KL, Yemm R, Vierck J, Dodson MV. (1997).** Insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGFBP secretion by ovine satellite cell strains grown alone or in coculture with 3T3-L1 preadipocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33(10):791-795.
- Hsu SY, Kubo M, Chun SY, Haluska FG, Housman DE, Hsueh AJ. (1995).** Wilms' tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in

expression during follicle development and repression of inhibin- $\alpha$  gene promoter. *Mol Endocrinol* 9(10):1356-1366.

- Hsueh AJ, Billig H, Tsafriri A. (1994).** Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15(6):707-724.
- Hu P, Mondino A, Skolnik EY, Schlessinger J. (1993).** Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Molec. Cell. Biol* 13: 7677-7688.
- Huang A, Campbell CE, Bonetta L, McAndrews-Hill MS, Chilton-MacNeill S, Coppes MJ, Law DJ, Feinberg AP, Yeger H, Williams BRG. (1990).** Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms tumor. *Science* 250(4983):991-994.
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. (1993).** The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157(1):100-109.
- Huang Y, Shin N-H, Sun Y, Wang KK, W. (2001).** Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 762-769.
- Huang D, Eudy JD, Uzvolgyi E, Davis JR, Talmadge CB, Pretto D, Weston MD, Lehman JE, Zhou M, Seemayer TA, Ahmad I, Kimberling WJ, Sumegi J. (2002).** Identification of the mouse and rat orthologs of the gene mutated in Usher syndrome type IIA and the cellular source of USH2A mRNA in retina, a target tissue of the disease. *Genomics* 80: 195-203
- Hubank M, Schatz DG. (1994).** Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22(25):5640-5648.
- Huber I, Rotman M, Pick E, Makler V, Rothem L, Cukierman E, Cassel D. (2001).** Expression, purification, and properties of ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase activating protein-1. *Methods Enzymol* 329:307-316.
- Hudson P, Haley J, Cronk M, Shine J, Niall H. (1981).** Molecular cloning and characterization of cDNA sequences coding for rat relaxin. *Nature* 291: 127-131.
- Hudson P, John M, Crawford R, Haralambidis J, Scanlon D, Gorman J, Tregear G, Shine, J.; Niall, H. (1984).** Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones. *EMBO J* 3: 2333-2339.
- Hunziker W, Geuze HJ. (1996).** Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* 18(5):379-89.
- Hunzicker-Dunn M, Gurevich VV, Casanova JE, Mukherjee S. (2002).** ARF6: a newly appreciated player in G protein-coupled receptor desensitization. *FEBS Lett* 521(1-3):3-8.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T. (1986).** Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil* 76(2):645-56.
- Iftode C, Daniely Y, Borowiec JA. (1999).** Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34(3):141-80.
- Imanishi T. et al. (2004).** Integrative Annotation of 21,037 Human Genes Validated by Full-Length cDNA Clones. *PLoS Biol* 2(6):E162.

- Inaba, T.; Matsushime, H.; Valentine, M.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J.; Look, A. T. (1992).** Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* 13: 565-574.
- Incerti B, Dong J, Borsani G, Matzuk MM. (1994).** Structure of the mouse growth/differentiation factor 9 gene. *Biochim Biophys Acta* 1222(1):125-8.
- Ireland JJ, Roche JF. (1982).** Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* 111(6):2077-86.
- Ireland JJ, Roche JF. (1983).** Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 112(1):150-6.
- Ireland JJ. (1987).** Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertil Suppl* 34:39-54.
- Ireland JL, Ireland JJ. (1994).** Changes in expression of inhibin/activin alpha, beta A and beta B subunit messenger ribonucleic acids following increases in size and during different stages of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows. *Biol Reprod* 50(3):492-501.
- Ishigura K, Kojima T, Taguchi O, Saito H, Muramatsu T, Kadomatsu K. (1999).** Syndecan-4 expression is associated with follicular atresia in mouse ovary. *Histochem Cell Biol* 112(1):25-33.
- Ishizaki J, Suzuki N, Higashino K, Yokota Y, Ono T, Kawamoto K, Fujii N, Arita H, Hanasaki K. (1999).** Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A(2)s. *J. Biol Chem* 274: 24973-24979.
- Isobe N, Nakao T, Yoshimura Y. (2003).** Distribution of cytochrome P450-side chain cleavage in the theca interna layers of bovine small antral and cystic follicles. *Reprod Domest Anim* 38(5):405-9.
- Itahana K, Morikazu Y, Takeya T. (1996).** Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. *Endocrinology*. 137(11):5036-5044.
- Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. (2002).** Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod* 67(4):1099-105.
- Ivell R. (1997).** Biology of the relaxin-like factor (RLF). *Rev Reprod* 2(3):133-8.
- Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O. (1999).** Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol* 156(1-2):189-93.
- Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. (1999).** Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci* 887:18-30.
- Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. (2001).** Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 86(3):1318-1323.
- Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera MW, O'Brien SJ, Modi WS, Maciag T, Drohan WN. (1986).** Human endothelial cell growth

factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 233(4763):541-5.

- John ME, John MC, Ashley P, MacDonald RJ, Simpson ER, Waterman MR. (1984).** Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(18):5628-32.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. (1999).** Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine* 10(1):43-51.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Bilski JJ, Grazul-Bilska AT. (2002).** Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 18(3):261-70.
- Johnson AL, Bridgham JT, Swenson JA. (2001).** Activation of the Akt/protein kinase B signaling pathway is associated with granulosa cell survival. *Biol Reprod* 64(5):1566-74.
- Johnson AL, Bridgham JT. (2002).** Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction* 124(1):19-27.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. (2004).** Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428(6979):145-50.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. (1993).** Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268(12):9049-54.
- Jones PB, Welsh TH Jr, Hsueh AJ. (1982).** Regulation of ovarian progesterone production by epidermal growth factor in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 257(19):11268-73.
- Jordan B. (2001).** ADNc : Les incontournables. *Médecine/Sciences* 17 : 81-84
- Jorgensen JS, Nilson JH. (2001).** AR suppresses transcription of the LHbeta subunit by interacting with steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol* 15(9):1505-16.
- Jorgensen, M.; Mortensen, J. Z.; Madsen, A. G.; Thorsen, S.; Jacobsen, B. (1982).** A family with reduced plasminogen activator activity in blood associated with recurrent venous thrombosis. *Scand J Haemat* 29: 217-223.
- Jorgez CJ, Klysiak M, Jamin SP, Behringer RR, Matzuk MM. (2004).** Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol Endocrinol* 18(4):953-67.
- Joseph LJ, Chang LC, Stamenkovich D, Sukhatme VP. (1988).** Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J Clin Invest* 81(5):1621-9.
- Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. (1999).** Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 60(5):1263-70.
- Juneja SC. (2003).** mRNA expression pattern of multiple members of connexin gene family in normal and abnormal fetal gonads in mouse. *Indian J Physiol Pharmacol* 47(2):147-56.

- Kabra NH, Kang C, Hsing LC, Zhang J, Winoto A. (2001).** T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. *Proc Nat Acad Sci* 98: 6307-6312.
- Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. (1996).** Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 137(11):4864-4870.
- Kaipia A, Hsueh AJ. (1997).** Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349-363.
- Kalma Y, Granot I, Galiani D, Barash A, Dekel N. (2004).** Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation. *Endocrinology* 145(4):1617-24.
- Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talanian RV, Allen H, Banach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P, Mankovich JA, Terranova M, Ghayur T. (1995).** Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1-beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 270: 15250-15256.
- Kawate N, Okuda K. (1998).** Coordinated expression of splice variants for luteinizing hormone receptor messenger RNA during the development of bovine corpora lutea. *Mol Reprod Dev* 51(1):66-75.
- Kenny MK, Lee SH, Hurwitz J. (1989).** Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24):9757-9761.
- Kenny MK, Schlegel U, Furneaux H, Hurwitz J. (1990).** The role of human single-stranded DNA binding protein and its individual subunits in simian virus 40 DNA replication. *J Biol Chem* 265(13):7693-7700.
- Kesner JS, Convey EM, Anderson CR. (1981).** Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology*. 108(4):1386-1391.
- Kezele P, Skinner MK. (2003).** Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 144(8): 3329-3337.
- Kidder GM, Mhawi AA. (2002).** Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 123(5):613-620.
- Kiefer MC, Ioh RS, Bauer DM, Zapf J. (1991).** Molecular cloning of a new human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem. Biophys Res Commun* 176: 219-225.
- Kiess W, Gallaher B. (1998).** Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 138(5):482-491.
- Kim JJ, Jaffe RC, Fazleabas AT. (1999).** Insulin-like growth factor binding protein-1 expression in baboon endometrial stromal cells: regulation by filamentous actin and requirement for de novo protein synthesis. *Endocrinology* 140(2):997-1004.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. (1992).** Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356(6369):526-529.
- Kjellen L, Lindahl U. (1991).** Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60:443-475.

- Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. (1997).** Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J* 16(15):4639-4649.
- Knecht M., Feng P., Catt K. (1987).** Bifunctional role of transforming growth factor beta during granulosa cell development. *Endocrinology* 120 : 1243-1249.
- Knight PG. (1996).** Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol* 17(4):476-509.
- Knight PG, Glistler C. (2001).** Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121(4):503-512.
- Knight PG, Glistler C. (2003).** Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 78(3-4):165-183.
- Knop M, Finger A, Braun T, Hellmuth K, Wolf DH. (1996).** Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J* 15(4):753-763.
- Ko JCH., Kastelic JP., Del Campo MR, Ginther OJ. (1991).** Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers. *J Reprod Fert* 91 : 511-519.
- Ko C, Park-Sarge OK (2000).** Progesterone receptor activation mediates LH-induced type-I pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor (PAC(1)) gene expression in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 277(1):270-279.
- Kolset SO, Prydz K, Pejler G. (2004).** Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 379(Pt 2):217-227.
- Komar CM, Berndtson AK, Evans AC, Fortune JE. (2001).** Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 64(6):1797-1805.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. (1998).** Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15677-15682.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. (1996).** Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Nat Acad Sci* 93: 5925-5930.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. (1997).** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3):863-870.
- Kulick LJ, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. (2001).** Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. *Biol Reprod* 65(3):839-846.
- Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. (1997).** Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 272(1):556-562.

- Kuno K, Matsushima K. (1998).** ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem* 273(22):13912-13917.
- Kuno K, Okada Y, Kawashima H, Nakamura H, Miyasaka M, Ohno H, Matsushima K. (2000).** ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett* 478(3):241-245.
- Kuno K, Terashima Y, Matsushima K. (1999).** ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. *J Biol Chem* 274(26):18821-18826.
- Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y. (1988).** Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Slt mice. *Dev Biol* 126(1):71-79.
- Laursen LS, Overgaard MT, Weyer K, Boldt HB, Ebbesen P, Christiansen M, Sottrup-Jensen L, Giudice LC, Oxvig C. (2002).** Cell surface targeting of pregnancy-associated plasma protein A proteolytic activity. Reversible adhesion is mediated by two neighboring short consensus repeats. *J Biol Chem* 277(49):47225-47234.
- Lavoie M, Fortune JE. (1990).** Follicular dynamics in heifers after injection of PGF2 alpha during the first wave of follicular development. *Theriogenology* 33 : 270 (Abs).
- Lawrence JB, Bale LK, Haddad TC, Clarkson JT, Conover CA. (1999).** Characterization and partial purification of the insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4-specific protease from human fibroblast conditioned media. *Growth Horm IGF Res* 9(1):25-34.
- Layman LC. (2000).** Mutations in the follicle-stimulating hormone-beta (FSH beta) and FSH receptor genes in mice and humans. *Semin Reprod Med* 18(1):5-10.
- Lecomte P. (1999a).** Régulation paracrine de la fonction ovarienne. In *Ovocyte et Embryon : De la physiologie à la pathologie*. Hamamah S., Ménézo Y. (Eds) Ellipses. pp 36-54.
- Lecomte P. (1999b).** Endocrinologie de l'ovulation. In *Ovocyte et Embryon : De la physiologie à la pathologie*. Hamamah S., Ménézo Y. (Eds) Ellipses. pp 55-70.
- Lee TH, Wisniewski HG, Vilcek J. (1992).** A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol* 116(2):545-557.
- Lenhart JA, Downey BR, Bagnell CA. (1998).** Connexin 43 gap junction protein expression during follicular development in the porcine ovary. *Biol Reprod* 58(2):583-90.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. (1995).** Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16(2):143-163.
- Levesque V, Fayad T, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. (2002).** Identification of hCG-induced gene expression in granulosa cells of bovine preovulatory follicles using suppressive subtractive hybridization. In: *Program of the 35th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction; 2002; Baltimore, MD. Abstract 275.*

- Levesque V, Fayad T, Ndiaye K, Nahe Diouf M, Lussier JG. (2003).** Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* 35(1):72-78.
- Leymarie P., Martal J (1991).** Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. . In *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. C. Thibault, M-C Levasseur (Eds) Ellipses INRA. pp 403-421.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Li R, Phillips DM, Mather JP. (1995).** Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology* 136(3):849-856.
- Liang P. (2002).** A decade of differential display. *Biotechniques* 33(2):338-44, 346.
- Liao WX, Goh HH, Roy AC. (2002).** Functional characterization of a natural variant of luteinizing hormone. *Hum Genet* 111(2):219-224.
- Lilley BN, Ploegh HL. (2004).** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429(6994):834-840.
- Lin SY, Morrison JR, Phillips DJ, de Kretser DM. (2003).** Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. *Reproduction* 126(2):133-148.
- Lintern-Moore S, Moore GP. (1979).** The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 20(4): 773-778.
- Lioutas C, Einspanier A, Kascheike B, Walther N, Ivell R. (1997).** An autocrine progesterone positive feedback loop mediates oxytocin upregulation in bovine granulosa cells during luteinization. *Endocrinology* 138(11):5059-5062.
- Liu J, Zhou R, Zhang N, Rui J, Jin C. (2000).** Biological function of a novel gene overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 113(10): 881-885.
- Liu X, Zhang C, Xing G, Chen Q, He F. (2001).** Functional characterization of novel human ARFGAP3. *FEBS Lett* 490(1-2):79-83.
- Liu X, Zhou R, Zhang Q, Zhang Y, Shao G, Jin Y, Zhang S, Lin M, Rui J, Ye D. (2003).** Identification and characterization of LAPTM4B encoded by a human hepatocellular carcinoma-associated novel gene. *Beijing Da Xue Xue Bao* 35(4):340-347.
- Liu XR, Zhou RL, Zhang QY, Zhang Y, Jin YY, Lin M, Rui JA, Ye DX. (2004).** Structure analysis and expressions of a novel tetratransmembrane protein, lysosoma-associated protein transmembrane 4 beta associated with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 10(11):1555-1559.
- Liu YX, Liu K, Feng Q, Hu ZY, Liu HZ, Fu GQ, Li YC, Zou RJ, Ny T. (2004).** Tissue-type plasminogen activator and its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 are coordinately expressed during ovulation in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 145(4):1767-1775.
- Lobb DK, Dorrington JH. (1993).** Transforming growth factor-alpha: identification in bovine corpus luteum by immunohistochemistry and northern blot analysis. *Reprod Fertil Dev* 5(5):523-529.
- Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. (2003).** Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in

vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 66(3):297-305.

- Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai-Luu Thi MT, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallal B, Garnier J, et al. (1989).** Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 245(4917):525-528.
- Luck MR, Zhao Y, Silvester LM. (1995).** Identification and localization of collagen types I and IV in the ruminant follicle and corpus luteum. *J Reprod Fertil Suppl* 49:517-521.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. (1998).** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4):481-490.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. (1987).** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 81(2):301-307.
- Lussier JG, Matton P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, Carruthers TD. (1994).** Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J Reprod Fertil* 102(1):95-105.
- Lussier JG, Sirois J, Price C, Carriere P, Silversides DW (2001).** Research in genomics applied at the undergraduate level: When research meets technopôle objectives. In: Programm of the 34th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2001; Ottawa, ON. Abstract 71.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. (1995).** Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9(18):2266-2278.
- Madan P, Bridges PJ, Komar CM, Beristain AG, Rajamahendran R, Fortune JE, MacCalman CD. (2003).** Expression of Messenger RNA for ADAMTS Subtypes Changes in the Perioovulatory Follicle after the Gonadotropin Surge and During Luteal Development and Regression in Cattle. *Biol Reprod* 69(5):1506-1514.
- Madhra M, Gay E, Fraser HM, Duncan WC. (2004).** Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Mol Hum Reprod* 10(8):599-603.
- Mangat H, Peterson LN, Burns KD. (1997).** Hypercalcemia stimulates expression of intrarenal phospholipase A2 and prostaglandin H synthase-2 in rats. Role of angiotensin II AT1 receptors. *J Clin Invest.* 1997 100(8):1941-1950.
- Mann GE, Lamming GE. (1994).** Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow. *Vet Rec*; 135(17):403-405.
- Manova K, Huang EJ, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P, Bachvarova RF. (1993).** The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 157(1):85-99.
- Mariana JC. (1972).** [Classification of ovarian follicles: principles and methods of study] *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 12(3):377-382.
- Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino JS. (1996).** Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* 135(2): 341-354.

- Markstrom E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H. (2002).** Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123(1):23-30.
- Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, et al. (1990).** Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 63(1):203-211.
- Martin KJ, Pardee AB. (1999).** Principles of differential display. *Methods Enzymol* 303:234-258.
- Mason AJ, Niall HD, Seeburg PH. (1986).** Structure of two human ovarian inhibins. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 957-964
- Martin-Gallardo A, McCombie WR, Gocayne JD, FitzGerald MG, Wallace S, Lee BM, Lamerdin J, Trapp S, Kelley JM, Liu LI, et al. (1992).** Automated DNA sequencing and analysis of 106 kilobases from human chromosome 19q13.3. *Nat Genet* 1(1):34-39.
- Massague J. (1990).** The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641.
- Massague J, Blain SW, Lo RS. (2000).** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103(2):295-309.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. (1992).** Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360(6402):313-319.
- Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. (1995).** Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374(6520):356-360.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. (2002).** Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296(5576):2178-2180.
- Mayerhofer A, Garfield RE. (1995).** Immunocytochemical analysis of the expression of gap junction protein connexin 43 in the rat ovary. *Mol Reprod Dev* 41(3):331-338.
- McArthur ME, Irving-Rodgers HF, Byers S, Rodgers RJ. (2000).** Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. *Biol Reprod* 63(3):913-924.
- McCracken JA, Custer EE, Eldering JA, Robinson AG. (1996).** The central oxytocin pulse generator: a pacemaker for the ovarian cycle. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56(3):819-32.
- McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosemblyt N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. (1989).** Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245(4917):494-499.
- McGee EA, Hsueh AJ. (2000).** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21(2):200-214.
- McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. (1995).** Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9(1):131-136.

- McLachlan RI, Robertson DM, de Kretser D, Burger HG. (1987).** Inhibin--a non-steroidal regulator of pituitary follicle stimulating hormone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1(1):89-112.
- McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. (1979).** The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 49(6):851-860.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ. (2000).** Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2):11-20.
- Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL, Conti M. (2002).** Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab* 13(1):29-35.
- Mellor SL, Cranfield M, Ries R, Pedersen J, Cancilla B, de Kretser D, Groome NP, Mason AJ, Risbridger GP. (2000).** Localization of activin beta(A)-, beta(B)-, and beta(C)-subunits in human prostate and evidence for formation of new activin heterodimers of beta(C)-subunit. *J Clin Endocr Metab* 85: 4851-4858.
- Mer G, Bochkarev A, Gupta R, Bochkareva E, Frappier L, Ingles CJ, Edwards AM, Chazin WJ. (2000).** Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA. *Cell* 103(3):449-456.
- Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC, Shows TB. (1986).** The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 138(2):644-651.
- Mermillod P., Le Lannon D. (1999).** Maturation ovocytaire in vivo et in vitro chez les mammifères. In *Ovocyte et Embryon : De la physiologie à la pathologie.* Hamamah S., Ménézo Y. (Eds) Ellipses. pp 94-122.
- Meyer MD, Hansen PJ, Thatcher WW, Drost M, Badinga L, Roberts RM, Li J, Ott TL, Bazer FW. (1995).** Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha of cows in response to recombinant interferon-tau. *J Dairy Sci* 1995 Sep;78(9):1921-1931.
- Mihm M, Good TE, Ireland JL, Ireland JJ, Knight PG, Roche JF. (1997).** Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in hivers. *Biol Reprod* 57(6): 1328-1337.
- Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. (2000).** Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 63(3):811-819.
- Millership JJ, Cai X, Zhu G. (2004).** Functional characterization of replication protein A2 (RPA2) from *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology* 150(Pt 5):1197-1205.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M (1990).** Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 172(3):1049-54.

- Minegishi, T.; Nakamura, K.; Takakura, Y.; Ibuki, Y.; Igarashi, M. (1991).** Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 175: 1125-1130.
- Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E. (1987).** Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 143(2):740-748.
- Mitchell PA, Burghardt RC. (1986).** The ontogeny of nexuses (gap junctions) in the ovary of the fetal mouse. *Anat Rec* 214(3):283-8.
- Mitsis PG. (1995).** Phosphorylation and localization of replication protein A during oogenesis and early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 170(2):445-456.
- Monget P., Monniaux D. (1995).** Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fert Suppl* 49 : 321-333.
- Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. (2002).** Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 23(1-2):139-154.
- Morbeck DE, Flowers WL, Britt JH. (1993).** Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. *J Reprod Fertil* 99(2):577-584.
- Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y, Okada Y, Sogawa K, Hirose T, Inayama S, Omura T. (1984).** Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(15):4647-4651.
- Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R. (1996).** ER-beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392: 49-53.
- Motokura, T.; Keyomarsi, K.; Kronenberg, H. M.; Arnold, A. (1992).** Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene. *J Biol Chem* 267: 20412-20415.
- Motro B, Bernstein A. (1993).** Dynamic changes in ovarian c-kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle. *Dev Dyn* 197(1):69-79.
- Mukherjee S, Gurevich VV, Jones JC, Casanova JE, Frank SR, Maizels ET, Bader MF, Kahn RA, Palczewski K, Aktories K, Hunzicker-Dunn M. (2000).** The ADP ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO promotes beta-arrestin release necessary for luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):5901-5906.
- Mukherjee S, Palczewski K, Gurevich V, Benovic JL, Banga JP, Hunzicker-Dunn M. (1999a).** A direct role for arrestins in desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2):493-498.
- Mukherjee S, Palczewski K, Gurevich VV, Hunzicker-Dunn M. (1999b).** beta-arrestin-dependent desensitization of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is prevented by a synthetic peptide corresponding to the third intracellular loop of the receptor. *J Biol Chem* 274(19):12984-12989.

- Muller T, Gromoll J, Simoni M. (2003).** Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2242-2249.
- Muller T, Gromoll J, Simula AP, Norman R, Sandhowe-Klaverkamp R, Simoni M. (2004).** The carboxyterminal peptide of chorionic gonadotropin facilitates activation of the marmoset LH receptor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 112(10):574-579.
- Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, Casano FJ, Miller DK, Molineaux SM, Yamin T-T, Yu VL, Nicholson DW. (1995).** Molecular cloning and proapoptotic activity of ICE(rel)II and ICE(rel)III, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 270: 15870-15876.
- Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG. (1987).** Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120(4):1279-1282.
- Murphy M, Pykett MJ, Harnish P, Zang KD, George DL. (1993).** Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ* 4: 715-722.
- Nakamura Y, Usui T, Mizuta H, Murabe H, Muro S, Suda M, Tanaka K, Tanaka I, Shimatsu A, Nakao K. (1999).** Characterization of Prophet of Pit-1 gene expression in normal pituitary and pituitary adenomas in humans. *J Clin Endocr Metab* 84: 1414-1419.
- Nagase T, Miyajima N, Tanaka A, Sazuka T, Seki N, Sato S, Tabata S, Ishikawa K, Kawarabayasi Y, Kotani H, et al. (1995).** Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081-KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res* 2(1): 37-43.
- Nahum R, Beyth Y, Chun SY, Hsueh AJ, Tsafiriri A. (1996).** Early onset of deoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biol Reprod* 55(5):1075-1080.
- Nasheuer HP, von Winkler D, Schneider C, Dornreiter I, Gilbert I, Fanning E. (1992).** Purification and functional characterization of bovine RP-A in an in vitro SV40 DNA replication system. *Chromosoma* 102(1 Suppl):S52-9.
- Natraj U, Richards JS. (1993).** Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 133(2):761-769.
- Nechamen CA, Thomas RM, Cohen BD, Acevedo G, Poulikakos PI, Testa JR, Dias JA. (2004).** Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Receptor Interacts with the Adaptor Protein APPL1 in HEK 293 Cells: Potential Involvement of the PI3K Pathway in FSH Signaling. *Biol Reprod* 71(2):629-636
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K. (1996).** Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9565-9570.
- Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY, Greenwood FC. (1971).** Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones:

- evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4):866-870.
- Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P. R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y. A.; Munday, N. A.; Raju, S. M.; Smulson, M. E.; Yamin, T.-T.; Yu, V. L.; Miller, D. K. (1995).** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43.
- Ninomiya-Tsuji, J.; Nomoto, S.; Yasuda, H.; Reed, S. I.; Matsumoto, K. (1991).** Cloning of a human cDNA encoding a CDC2-related kinase by complementation of a budding yeast *cdc28* mutation. *Proc Nat Acad Sci* 88: 9006-9010.
- Noseir WM. (2003).** Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod Biol Endocrinol* 1(1):50.
- Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, Flechon JE. (2000).** Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev* 57(1):60-66.
- Ny T, Sawdey M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ. (1986).** Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc Nat Acad Sci* 83: 6776-6780.
- Oba K, Yanase T, Nomura M, Morohashi K, Takayanagi R, Nawata H. (1996).** Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 261-267.
- Ochsner SA, Day AJ, Rugg MS, Breyer RM, Gomer RH, Richards JS. (2003).** Disrupted function of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. *Endocrinology* 144(10):4376-4384.
- Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim H-S, Wilson E, Rosenfeld RG. (1996).** Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. *J Biol Chem* 271: 30322-30325.
- Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA, Clayton RN. (1989).** Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 124(6):2671-2679.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1993).** Bcl-2 heterodimers in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619
- O'Shaughnessy PJ, Dudley K, Rajapaksha WR. (1996).** Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 125(1-2):169-175.
- Ota T et al. (2004).** Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36(1):40-45.
- Otsu, M.; Hiles, I.; Gout, I.; Fry, M. J.; Ruiz-Larrea, F.; Panayotou, G.; Thompson, A.; Dhand, R.; Hsuan, J.; Totty, N.; Smith, A. D.; Morgan, S. J.; Courtneidge, S. A.; Parker, P. J.; Waterfield, M. D. (1991).** Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60(c-src) complexes, and PI3-kinase. *Cell* 65: 91-104.

- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. (2000).** Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275(50):39523-39528.
- Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. (2001).** Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun* 289(5):961-966.
- Oussaid B, Mariana JC, Poulin N, Fontaine J, Lonergan P, Beckers JF, Cognie Y. (1999).** Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil* 117(1):71-77.
- Oussaid B, Lonergan P, Khatir H, Guler A, Monniaux D, Touze JL, Beckers JF, Cognie Y, Mermillod P. (2000).** Effect of GnRH antagonist-induced prolonged follicular phase on follicular atresia and oocyte developmental competence in vitro in superovulated heifers. *J Reprod Fertil* 118(1):137-144.
- Overgaard MT, Boldt HB, Laursen LS, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. (2001).** Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J Biol Chem* 276(24):21849-21853.
- Ozawa M, Shi F, Watanabe G, Suzuki AK, Taya K. (2001).** Regulatory role of inhibin in follicle-stimulating hormone secretion and folliculogenesis in the guinea pig. *J Vet Med Sci* 63(10):1091-1095.
- Park JI, Kim WJ, Wang L, Park HJ, Lee J, Park JH, Kwon HB, Tsafri A, Chun SY. (2000).** Involvement of progesterone in gonadotrophin-induced pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression in pre-ovulatory follicles of rat ovary. *Mol Hum Reprod* 6(3):238-245.
- Park OK, Mayo KE. (1991).** Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* 5(7):967-978.
- Parker KL, Ikeda Y, Luo X. (1996).** The roles of steroidogenic factor-1 in reproductive function. *Steroids*. 61(4):161-165.
- Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Wong M, Bakke M, Zhao L, Frigeri C, Hanley NA, Stallings N, Schimmer BP. (2002).** Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res*. 57:19-36.
- Pate JL. (1994).** Cellular components involved in luteolysis. *J Anim Sci* 72(7):1884-1890.
- Pate JL (2003).** Lives in the balance: responsiveness of the corpus luteum to uterine and embryonic signals. *Reprod Suppl* 61:207-217.
- Peng ZG, Calvert I, Clark J, Helman L, Kahn R, Kung HF. (1989).** Molecular cloning, sequence analysis and mRNA expression of human ADP-ribosylation factor. *Biofactors* 2(1):45-49.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T. (1991).** Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 129(6):3200-3207.
- Pennetier S, Uzbekova S, Perreau C, Papillier P, Mermillod P, Dalbies-Tran R. (2004).** Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*,

- ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 71(4):1359-1366
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. (1984).** Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724-729.
- Perez-Armendariz EM, Saez JC, Bravo-Moreno JF, Lopez-Olmos V, Enders GC, Villalpando I. (2003).** Connexin43 is expressed in mouse fetal ovary. *Anat Rec* 271A(2):360-367.
- Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M. (1975).** Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil* 45(3): 559-566.
- Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. (1986).** Cloning and expression of cDNA for anti-mullerian hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(15):5464-5468.
- Politis I, Wang L, Turner JD, Tsang BK. (1990).** Changes in tissue-type plasminogen activator-like and plasminogen activator inhibitor activities in granulosa and theca layers during ovarian follicle development in the domestic hen. *Biol Reprod* 42(5-6):747-754.
- Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, Neufeld G. (1997).** VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272: 7151-7158.
- Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. (1994).** Cloning of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. (1999).** The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 20(4):535-582.
- Porter DA, Harman RM, Cowan RG, Quirk SM. (2001).** Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction* 121(4): 561-566.
- Powner DJ, Wakelam MJ. (2002).** The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases. *FEBS Lett* 531(1):62-64.
- Pru JK, Rueda BR, Austin KJ, Thatcher WW, Guzeloglu A, Hansen TR. (2001).** Interferon-tau suppresses prostaglandin F2alpha secretion independently of the mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B pathways. *Biol Reprod* 64(3):965-973.
- Prydz K, Dalen KT. (2000).** Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113 Pt 2:193-205.
- Rasmussen H, Kojima I, Kojima K, Zawalich W, Apfeldorf W. (1984).** Calcium as intracellular messenger: sensitivity modulation, C-kinase pathway, and sustained cellular response. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 18:159-193.
- Rauscher FJ 3rd. (1993).** The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J* 7(10):896-903.

- Reaves BJ, Banting G, Luzio JP. (1998).** Luminal and transmembrane domains play a role in sorting type I membrane proteins on endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 9(5): 1107-22.
- Reed KE, Westphale EM, Larson DM, Wang HZ, Veenstra RD, Beyer EC. (1993).** Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein. *J Clin Invest* 91(3):997-1004.
- Regazzi R, Kikuchi A, Takai Y, Wollheim CB. (1992).** The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. : *J Biol Chem* 267(25):17512-17519.
- Remy JJ, Nespoulous C, Grosclaude J, Grebert D, Couture L, Pajot E, Saless R. (2001).** Purification and structural analysis of a soluble human choriongonadotropin hormone-receptor complex. *J Biol Chem* 276(3):1681-1687.
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. (1993).** Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259(5098):1157-1161.
- Rheaume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, New MI, Labrie F. (1992).** Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nat Genet* 1(4):239-245.
- Richards JS. (1994).** Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15(6):725-751.
- Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J. (1995).** Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog Horm Res* 50:223-254.
- Richards JS, Hedin L. (1988).** Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol* 50:441-463.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. (2002).** Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 57:195-220.
- Richards JS. (2001a).** New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15(2):209-218.
- Richards JS. (2001b).** Graafian follicle function and luteinization in nonprimates. *J Soc Gynecol Investig* 8(1 Suppl Proceedings):S21-3.
- Rivera GM, Chandrasekher YA, Evans AC, Giudice LC, Fortune JE. (2001).** A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biol Reprod* 65(1):102-111.
- Rivera GM, Fortune JE. (2001).** Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol Reprod* 65(1):112-118.
- Rivera GM, Fortune JE. (2003a).** Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* 144(2):437-446.

- Rivera GM, Fortune JE. (2003b).** Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 144(7):2977-2987.
- Roberts RM. (1989).** A novel group of interferons associated with the early ovine and bovine embryo. *J Interferon Res* 9(4):373-378.
- Roberts RM. (1993).** Interferon-tau. *Nature*. 362(6421):583.
- Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy A, Yen SS. (1993).** Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77(5):1402-1410.
- Roberts AJ, Echtenkamp SE. (2003).** Insulin-like growth factor binding proteins in granulosa and thecal cells from bovine ovarian follicles at different stages of development. *J Anim Sci* 81(11):2826-2839.
- Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG, de Kretser DM. (1987).** The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun* 149(2):744-749.
- Robker RL, Richards JS. (1998).** Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 12(7):924-940.
- Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. (2000).** Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4689-4694.
- Roche JF. (1996).** Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev Reprod* 1(1):19-27.
- Roche JF., Boland MP. (1991).** Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology* 35 : 81-90.
- Rombauts L, Suikkari AM, MacLachlan V, Trounson AO, Healy DL. (1998).** Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril.* 69(4):665-669.
- Rose EA, Glaser T, Jones C, Smith CL, Lewis WH, Call KM, Minden M, Champagne E, Bonetta L, Yeger H, Housman DE. (1990).** Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* 60: 405-508.
- Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. (2001).** Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 122(2):215-226.
- Roy SK. (1993).** Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol Reprod* 48(3):552-557.
- Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS. (2003b).** Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem* 278(43):42330-42339.
- Russell DL, Ochsner SA, Hsieh M, Mulders S, Richards JS. (2003a).** Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology* 144(3):1020-1031.

- Salerno G, Verde P, Nolli ML, Corti A, Szots H, Meo T, Johnson J, Bullock S, Cassani G, Blasi F. (1984).** Monoclonal antibodies to human urokinase identify the single-chain pro-urokinase precursor. *Proc Nat Acad Sci* 81: 110-114.
- Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC. (1999).** Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum Reprod Update* 5(4):293-301.
- Salvador LM, Mukherjee S, Kahn RA, Lamm ML, Fazleabas AT, Maizels ET, Bader MF, Hamm H, Rasenick MM, Casanova JE, Hunzicker-Dunn M. (2001).** Activation of the luteinizing hormone/choriogonadotropin hormone receptor promotes ADP ribosylation factor 6 activation in porcine ovarian follicular membranes. *J Biol Chem* 276(36):33773-33781.
- Sambrook J, Russell DW. (2001).** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, Zimmermann DR, Lemire JM, Fischer JW, Wight TN, Clowes AW. (2001).** Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem* 276(16):13372-13378.
- Sargent TD, Dawid IB. (1983).** Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* 222(4620):135-139.
- Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC. (2001).** Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 65(5):1403-1409.
- Sasano H, Sasano N, Okamoto M. (1989).** Immunohistochemical demonstration of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 in bovine and human adrenals. *Pathol Res Pract* 184(3):337-342.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. (1988).** Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 83(2):663-671.
- Savion N, Lui GM, Laherty R, Gospodarowicz D. (1981).** Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endocrinology* 109(2):409-420.
- Savion N, Laherty R, Lui GM, Gospodarowicz D. (1982).** Modulation of low density lipoprotein metabolism in bovine granulosa cells as a function of their steroidogenic activity. *J Biol Chem* 256(24):12817-12822.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. (1998).** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17(6):1675-1687.
- Schams D, Berisha B. (2004).** Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. *Reprod Domest Anim* 39(4):241-251.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL. (1995).** Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15(12):8281-8294.
- Schuler M, Bossy-Wetzl E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. (2000).** p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 275(10):7337-7342.

- Schwartzman RA, Cidlowski JA. (1993).** Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology* 133(2):591-599.
- Seeburg PH, Adelman JP. (1984).** Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 311(5987):666-668.
- Seilhamer JJ, Randall TL, Yamanaka M, Johnson LK. (1986).** Pancreatic phospholipase A(2): isolation of the human gene and cDNAs from porcine pancreas and human lung. *DNA* 5: 519-527.
- Shao GZ, Zhou RL, Zhang QY, Zhang Y, Liu JJ, Rui JA, Wei X, Ye DX. (2003).** Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22(32): 5060-5069.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. (1997).** Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27(Kip1). *Genes Dev* 11: 1464-1478
- Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N, Terada T. (2003).** Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 68(4):1142-1149.
- Shimasaki S, Koga M, Esch F, Cooksey K, Mercado M, Koba A, Ueno N, Ying SY, Ling N, Guillemin R. (1988).** Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12):4218-4222.
- Shimasaki S, Koga M, Buscaglia ML, Simmons DM, Bicsak TA, Ling N. (1989).** Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol Endocrinol* 3(4):651-659.
- Shimasaki, S.; Gao, L.; Shimonaka, M.; Ling, N. (1991).** Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factor-binding protein-6. *Molec Endocr* 5: 938-948.
- Shome B, Parlow AF. (1973).** The primary structure of the hormone-specific, beta subunit of human pituitary luteinizing hormone (hLH). *J Clin Endocrinol Metab* 36(3):618-621.
- Shome B, Parlow AF. (1974a).** Human follicle stimulating hormone (hFSH): first proposal for the amino acid sequence of the alpha-subunit (hFSHa) and first demonstration of its identity with the alpha-subunit of human luteinizing hormone (hLHa). *J Clin Endocrinol Metab* 39(1):199-202.
- Shome B, Parlow AF. (1974b).** Human follicle stimulating hormone: first proposal for the amino acid sequence of the hormone-specific, beta subunit (hFSHb). *J Clin Endocrinol Metab* 39(1):203-205.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. (1996).** Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384(6608):470-474.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC. (2001).** The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 276(36):33293-33296.

- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. (1997).** Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385(6616):525-529.
- Singh J, Adams GP. (1998).** Immunohistochemical distribution of follistatin in dominant and subordinate follicles and the corpus luteum of cattle. *Biol Reprod* 59(3):561-570.
- Singh J, Brogliatti GM, Christensen CR, Adams GP. (1999).** Active immunization against follistatin and its effect on FSH, follicle development and superovulation in heifers. *Theriogenology* 52(1):49-66.
- Sirois J, Dore M. (1997).** The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology* 138(10):4427-4434.
- Sirois J, Fortune JE. (1988).** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 39(2):308-317.
- Sirois J, Richards JS. (1993).** Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. *J Biol Chem* 268(29):21931-21938.
- Sirois J, Simmons DL, Richards JS. (1992).** Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 267(16):11586-11592.
- Sirois J. (1994).** Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135(3):841-848.
- Sisco B, Hagemann LJ, Shelling AN, Pfeiffer PL. (2003).** Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology* 144(9):3904-3913.
- Skinner MK, Lobb D, Dorrington JH. (1987).** Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology* 121(5):1892-1899.
- Skinner MK, Coffey RJ Jr. (1988).** Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocrinology* 123(6):2632-2638.
- Smith TP, Fahrenkrug SC, Rohrer GA, Simmen FA, Rexroad CE, Keele JW. (2001).** Mapping of expressed sequence tags from a porcine early embryonic cDNA library. *Anim Genet* 32(2):66-72.
- Smitz JE, Cortvrindt RG. (2002).** The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 123(2):185-202.
- Solary E., Bettaieb A. Dubrez-Daloz L., Garrido C. (2002).** Implications physiologiques des altérations des gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire. *Médecine/Science* 8-9(18) : 861-873.
- Sommersberg B, Bulling A, Salzer U, Frohlich U, Garfield RE, Amsterdam A, Mayerhofer A. (2000).** Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 63(6):1661-1668.
- Song L, Fricker LD. (1995).** Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary. *J Biol Chem* 270(42):25007-25013.

- Soto E, Silavin SL, Tureck RW, Strauss JF 3rd. (1984).** Stimulation of progesterone synthesis in luteinized human granulosa cells by human chorionic gonadotropin and 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate: the effect of low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 58(5):831-837.
- Soumano K, Lussier JG, Price CA. (1998).** Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. *J Endocrinol.* 156(2):373-378.
- Spanos S, Rice S, Karagiannis P, Taylor D, Becker DL, Winston RM, Hardy K. (2002).** Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction* 124(3):353-363.
- Sparkes RS, Cohn VH, Cire-Eversole P, Blatt C, Amatruda TT, Weiner LP, Nesbitt M, Reed RR, Lochrie MA, Fournier REK, Simon MI. (1987a).** Mapping of genes encoding the subunits of guanine nucleotide-binding proteins (G-proteins) in the mouse. (Abstract) *Cytogenet Cell Genet* 46: 696.
- Sparkes RS, Cohn VH, Mohandas T, Zollman S, Cire-Eversole P, Amatruda TT, Reed RR, Lochrie MA, Simon MI. (1987b).** Mapping of genes encoding the subunits of guanine nucleotide-binding protein (G-proteins) in humans. (Abstract) *Cytogenet Cell Genet* 46: 696.
- Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. (1993).** Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci* 71(5):1232-1241.
- Spicer LJ, Echternkamp SE. (1995).** The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 12(3):223-245.
- Spicer LJ. (2004).** Proteolytic Degradation of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins by Ovarian Follicles: A Control Mechanism for Selection of Dominant Follicles. *Biol Reprod* 70(5):1223-1230
- Staal S. P. (1987).** Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Nat Acad Sci* 84: 5034-5037.
- Stauber GB, Aiyer RA, Aggarwal BB. (1988).** Human tumor necrosis factor-alpha receptor: purification by immunoaffinity chromatography and initial characterization. *J Biol Chem* 263: 19098-19104.
- Stetler-Stevenson, W. G.; Krutzsch, H. C.; Liotta, L. A. (1989).** Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2): a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264: 17374-17378.
- Stevens RL, Avraham S, Gartner MC, Bruns GA, Austen KF, Weis JH. (1998).** Isolation and characterization of a cDNA that encodes the peptide core of the secretory granule proteoglycan of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 263(15):7287-7291
- Stewart C, Parente F, Piehl F, Farnebo F, Quincey D, Silins G, Bergman L, Carle GF, Lemmens I, Grimmond S, Xian CZ, Khodei S, Teh BT, Lagercrantz J, Siggers P, Calender A, Van de Vem V, Kas K, Weber G, Hayward N, Gaudray P, Larsson C. (1998).** Characterization of the mouse

Men1 gene and its expression during development. *Oncogene* 17(19):2485-2493.

- Stocco DM, Clark BJ, Reinhart AJ, Williams SC, Dyson M, Dassi B, Walsh LP, Manna PR, Wang XJ, Zeleznik AJ, Orly J. (2001).** Elements involved in the regulation of the StAR gene. *Mol Cell Endocrinol* 177(1-2):55-59.
- Stoyanov B, Volinia S., Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, Gierschik P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD, Wetzker R. (1995).** Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269: 690-693.
- Sturm RA, Cassady JL, Das G, Romo A, Evans GA. (1993).** Chromosomal structure and expression of the human OTF1 locus encoding the Oct-1 protein. *Genomics* 16: 333-341.
- Strausberg RL. et al. (2002).** Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16899-16903.
- Strickland S, Beers WH. (1976).** Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J Biol Chem* 251(18):5694-5702.
- Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS. (2002).** Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 13(2):66-74.
- Sugawara T, Lin D, Holt JA, Martin KO, Javitt NB, Miller WL, Strauss JF 3rd. (1995).** Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry* 34(39):12506-12512.
- Sukhodolets KE, Hickman AB, Agarwal SK, Sukhodolets MV, Obungu VH, Novotny EA, Crabtree JS, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. (2003).** The 32-kilodalton subunit of replication protein A interacts with menin, the product of the MEN1 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biol* 23(2):493-509.
- Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH. (1994).** Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res* 54(5):1139-1144.
- Sunderland SJ, Knight PG, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. (1996).** Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 54(2):453-462.
- Sundstrom M, Lundqvist T, Rodin J, Giebel LB, Milligan D, Norstedt G. (1996).** Crystal structure of an antagonist mutant of human growth hormone, G120R, in complex with its receptor at 2.9 Å resolution. *J Biol Chem* 271(50):32197-32203.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. (1996).** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184(4):1331-1341.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak**

- TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. (2000).** Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192(4):571-580.
- Svensson EC, Markstrom E, Andersson M, Billig H. (2000).** Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 63(5):1457-1464.
- Szöllosi D. (1991).** Maturation de l'ovocyte. In *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. C. Thibault, M-C Levasseur (Eds) Ellipses INRA. pp 299-314.
- Taketo M, Rochelle JM, Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S, Seldin MF. (1994).** Mapping of the genes encoding mouse thromboxane A2 receptor and prostaglandin E receptor subtypes EP2 and EP3. *Genomics* 19(3):585-588.
- Tamura T, Kitawaki J, Yamamoto T, Osawa Y, Kominami S, Takemori S, Okada H. (1992).** Immunohistochemical localization of 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase and aromatase cytochrome P-450 in the human ovary during the menstrual cycle. *J Endocrinol* 135(3):589-595
- Tapanainen JS, Vaskivuo T, Aittomaki K, Huhtaniemi IT. (1998).** Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. *Mol Cell Endocrinol* 145(1-2):129-135.
- Tassell RJ, Kennedy JP, Bindon BM, Piper LR. (1983).** Ovarian follicles of newborn Merino lambs from genetic lines which differ in fecundity. *Aust J Biol Sci* 36(4):351-355.
- Tavares AB, Esplin MS, Adashi EY. (2001).** Differential hybridization and other strategies to identify novel ovarian genes. *Semin Reprod Med* 19(2):167-173.
- Tetsuka M, Hillier SG. (1997).** Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61(3-6):233-239.
- Thatcher WW, de la Sota RL, Schmitt EJ, Diaz TC, Badinga L, Simmen FA, Staples CR, Drost M. (1996).** Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod Fertil Dev* 8(2):203-217.
- Themmen AP, Martens JW, Brunner HG. (1998).** Activating and inactivating mutations in LH receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 145(1-2):137-142.
- Thompson CB. (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203):1456-1462.
- Tilly JL. (1996).** The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia, and luteolysis. *Front Biosci* 1:d1-d11.
- Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J. C.; Abraham, J. A. (1991).** The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266: 11947-11954.
- Tisdall DJ, Hudson N, Smith P, McNatty KP. (1994).** Localization of ovine follistatin and alpha and beta A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* 12(2):181-193.
- Tortoriello DV, Sidis Y, Holtzman DA, Holmes WE, Schneyer AL. (2001).** Human follistatin-related protein: a structural homologue of follistatin with nuclear localization. *Endocrinology* 142(8):3426-3434.

- Tosser-Klopp G, Benne F, Bonnet A, Mulsant P, Gasser F, Hatey F. (1997).** A first catalog of genes involved in pig ovarian follicular differentiation. *Mamm Genome* 8(4):250-254.
- Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C. (1998).** A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18(4):319-324.
- Toyoshima, H.; Hunter, T. (1994).** p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78: 67-74
- Tricoli JV, Rall LB, Scott J, Bell GI, Shows TB. (1984).** Insulin-like growth factor genes: chromosome organization and association with disease. *Am J Hum Genet* 36: 121S.
- Troy CM, Salvesen GS. (2002).** Caspases on the brain. *J Neurosci Res* 69(2):145-50.
- Troyer DA, Schwertz DW, Kreisberg JI, Venkatachalam MA. (1986).** Inositol phospholipid metabolism in the kidney. *Annu Rev Physiol* 48:51-71.
- Tsafri A, Dekel N, Bar-Ami S. (1982).** The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fertil.* 64(2):541-551.
- Tsafri A, Reich R. (1999).** Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107(1):1-11.
- Tsafri A. (1995).** Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* 377:121-140.
- Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Dufau ML. (1990).** Intronic nature of the rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity. *J Biol Chem* 265(32):19385-19388.
- Tsai MY, Lan KC, Huang KE, Huang FJ, Kung FT, Chang SY. (2003).** Significance of mRNA levels of connexin37, connexin43, and connexin45 in luteinized granulosa cells of controlled hyperstimulated follicles. *Fertil Steril* 80(6):1437-1443.
- Tsiftoglou AS, Georgatsos JG. (1972).** Metabolism of nucleosides by isolated mouse liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 262(3): 239-246.
- Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. (1984).** Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224: 1403-1406.
- Tureck RW, Strauss JF 3rd. (1982).** Progesterone synthesis by luteinized human granulosa cells in culture: the role of de novo sterol synthesis and lipoprotein-carried sterol. *J Clin Endocrinol Metab* 54(2):367-373.
- Ueno N, Baird A, Esch F, Ling N, Guillemin R. (1987a).** Isolation and partial characterization of basic fibroblast growth factor from bovine testis. *Mol Cell Endocrinol* 49(2-3):189-194.
- Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R. (1987b).** Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(23):8282-8286.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita-Yamaguchi Y. (1986).** Insulin-like growth factor I receptor primary

- structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5: 2503-2512.
- Umbrecht CB, Erdile LF, Jabs EW, Kelly TJ. (1993).** Cloning, overexpression, and genomic mapping of the 14-kDa subunit of human replication protein A. *J Biol Chem* 268(9):6131-6138.
- Vanhaesebroeck, B.; Alessi, D. R. (2000).** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346: 561-576.
- Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG, Ilic MZ, Handley CJ, Kelner GS, Clark M, Liu C, Maki RA, Burnett D, Buttle DJ. (2001).** Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem* 268(5):1259-1268.
- Varani J, Perone P, Fligel SE, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2002).** Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J Invest Dermatol* 119(1):122-129.
- Varlamov O, Eng FJ, Novikova EG, Fricker LD. (1999).** Localization of metalloproteinase D in AtT-20 cells. Potential role in prohormone processing. *J Biol Chem* 274(21):14759-14767.
- Vashist S, Ng DT. (2004).** Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 165(1):41-52.
- Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, Iruela-Arispe ML. (1999).** METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 274(33):23349-23357.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. (1995).** Serial analysis of gene expression. *Science* 270(5235):484-487.
- Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, Waterfield MD. (1994).** Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene. *Genomics*. 24(3):472-477.
- von Stein OD, Thies WG, Hofmann M. (1997).** A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 25(13):2598-2602.
- Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F. (1997).** Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Nat Acad Sci* 94: 4440-4445.
- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert J-M, Jeltsch J-M, Staub A, Jensen E, Scrase G, Waterfield M, Chambon P. (1985).** Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Nat Acad Sci* 82: 7889-7893.
- Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. (1992).** Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod* 47(5):807-813.
- Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. (1996).** Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 55(5):942-8.

- Wang X, Feuerstein GZ. (2000).** Suppression subtractive hybridisation: application in the discovery of novel pharmacological targets. *Pharmacogenomics* 1(1):101-108.
- Wang X, Yaish-Ohad S, Li X, Barone FC, Feuerstein GZ. (1998).** Use of suppression subtractive hybridization strategy for discovery of increased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression in brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(11):1173-1177.
- Wang Z, Brown DD. (1991).** A gene expression screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24):11505-11509.
- Wang AM, Creasey AA, Ladner MB, Lin LS, Strickler J, Van Arsdell JN, Yamamoto R, Mark DF. (1985).** Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228: 149-154.
- Wang K, Yin X-M, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1996).** BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10: 2859-2869
- Wang H, Guan J, Wang H, Perrault AR, Wang Y, Iliakis G. (2001).** Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 61(23):8554-8563.
- Watkins PC, Eddy R, Beck AK, Vellucci V, Leverone B, Tanzi RE, Gusella JF, Shows TB. (1987).** DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *DNA* 6(3):205-212.
- Webb R, Gong JG, Law AS, Rusbridge SM. (1992).** Control of ovarian function in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 45:141-156.
- Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. (1999).** Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Suppl* 54:33-48.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. (2003).** Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 61:71-90.
- Weiler MC, Smith JL, Masters JN. (1996).** CR16, a novel proline-rich protein expressed in rat brain neurons, binds to SH3 domains and is a MAP kinase substrate. *J Mol Neurosci* 7(3):203-215.
- Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A. (2002).** Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol* 227(9):724-752
- Westling J, Gottschall PE, Thompson VP, Cockburn A, Perides G, Zimmermann DR, Sandy JD. (2003).** ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at GLU405-GLN406 to generate glial hyaluronate binding protein (GHAP). *Biochem J* 377(Pt 3):787-795.
- White S, Hatton SR, Siddiqui MA, Parker CD, Trowbridge IS, Collawn JF. (1998).** Analysis of the structural requirements for lysosomal membrane targeting using transferrin receptor chimeras. *J Biol Chem* 273(23): 14355-14362.
- Wiemann S, Weil B, Wellenreuther R, Gassenhuber J, Glassl S, Ansorge W, Bocher M, Blocker H, Bauersachs S, Blum H, Lauber J, Dusterhoft A, Beyer A, Kohrer K, Strack N, Mewes HW, Ottenwalder B, Obermaier B,**

- Tampe J, Heubner D, Wambutt R, Korn B, Klein M, Poustka A. (2001).** Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Res* 11(3):422-435.
- Wilhelm D, Englert C. (2002).** The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl. *Genes Dev.* 16(14):1839-1851.
- Wilkin F, Suarez-Huerta N, Robaye B, Peetermans J, Libert F, Dumont JE, Maenhaut C. (1997).** Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *Eur J Biochem* 248(3): 660-668.
- Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. (1999).** Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1(6):E157-62.
- Wold MS. (1997).** Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66:61-92.
- Wong WY, Richards JS. (1991).** Evidence for two antigenically distinct molecular weight variants of prostaglandin H synthase in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5(9):1269-1279.
- Wood WI, Cachianes G, Henzel WJ, Winslow GA, Spencer SA, Hellmiss R, Martin JL, Baxter RC. (1988).** Cloning and expression of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein. *Molec Endocr* 2: 1176-1185.
- Woodruff TK. (1998).** Regulation of cellular and system function by activin. *Biochem Pharmacol* 55(7):953-963.
- Wrathall JH, Knight PG. (1995).** Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *J Endocrinol* 145(3):491-500.
- Wu L, Einstein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S. (1993).** Expression cloning and characterization of human 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268: 12964-12969.
- Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA III, Rosenfeld MG. (1998).** Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 18(2):147-149.
- Wu X, Chen L, Brown CA, Yan C, Matzuk MM. (2004).** Interrelationship of growth differentiation factor 9 and inhibin in early folliculogenesis and ovarian tumorigenesis in mice. *Mol Endocrinol* 18(6):1509-1519.
- Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. (1992).** Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131(3):1009-1016.
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. (1995a).** Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* 53(4):951-957.

- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. (1995b).** Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology* 136(3):981-989.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. (2001).** Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15(6):854-866.
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA. (2004).** A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429(6994):841-847.
- Yeager M, Nicholson BJ. (1996).** Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 6(2):183-192.
- Yoshioka S, Ochsner S, Russell DL, Ujioka T, Fujii S, Richards JS, Espey LL. (2000).** Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Endocrinology* 141(11):4114-4119.
- Yuan J, Angelucci E, Lucarelli G, Aljurf M, Snyder LM, Kiefer CR, Ma L, Schrier SL. (1993).** Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia) *Blood* 82(2):374-377.
- Zeleznik AJ. (2001a).** Modifications in gonadotropin signaling: a key to understanding cyclic ovarian function. *J Soc Gynecol Investig* 8(1 Suppl Proceedings):S24-25.
- Zeleznik AJ. (2001b).** Follicle selection in primates: "many are called but few are chosen". *Biol Reprod* 65(3):655-659.
- Zeleznik AJ, Saxena D, Little-Ihrig L. (2003).** Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144(9):3985-3994.
- Zhang C, Yu Y, Zhang S, Liu M, Xing G, Wei H, Bi J, Liu X, Zhou G, Dong C, Hu Z, Zhang Y, Luo L, Wu C, Zhao S, He F. (2000).** Characterization, chromosomal assignment, and tissue expression of a novel human gene belonging to the ARF GAP family. *Genomics* 63(3):400-408
- Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. (2001).** Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and interleukin-1 beta release in human subcutaneous adipocytes and preadipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2817-2825.
- Zhu BT, Conney AH. (1998).** Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res* 58(11):2269-2277.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R. (2002).** Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*. 110(4):443-455.
- Zhuo L, Kimata K. (2001).** Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 26(4):189-196.
- Zhuo L, Yoneda M, Zhao M, Yingsung W, Yoshida N, Kitagawa Y, Kawamura K, Suzuki T, Kimata K. (2001).** Defect in SHAP-hyaluronan complex causes

severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem* 276(11):7693-766.

**Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. (1997).** APAF-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413.

**Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M. (2002).** Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sci* 64(10):879-885.

