

Université de Montréal

**Une approche moléculaire pour mieux comprendre l'infertilité chez la vache
laitière**

par

LAURIANNE GAGNON-DUVAL

Département de biomédecine
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
maître en sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option reproduction

Novembre 2015

© Laurianne Gagnon-Duval, 2015

Résumé

Au cours des dernières années, une sélection génétique importante a été faite pour améliorer la production de lait des bovins, ceci au détriment des performances reproductives. Cette diminution de performance n'a cependant pas été rapportée chez la génisse présentant un même potentiel génétique. Cette immense production de lait et les changements métaboliques qui l'accompagnent ont donc un impact négatif sur l'efficacité reproductive des vaches laitières qui subissent un stress métabolique supérieur à celui des génisses. Le but de l'étude était d'acquérir une meilleure connaissance des différences moléculaires et métaboliques entre ces deux groupes d'animaux pour amener à une meilleure compréhension de la pathogenèse de l'infertilité chez la vache laitière. Pour ce faire, les vagues folliculaires de vaches en lactation (30-50 jours en lait; N = 12) et de génisses (N = 10) ont été synchronisées par ablation écho guidée des follicules et par traitement hormonal avec injection de prostaglandine et insertion d'un implant de progestérone. L'aspiration du liquide folliculaire et des cellules de la granulosa du follicule dominant a été faite au jour 6. Les paramètres métaboliques mesurés chez les animaux à partir de prises de sang, faites au jour 6, confirment un plus grand stress métabolique chez la vache, les niveaux de BHBA, acides biliaires et cholestérol étant plus élevés et le niveau de glucose plus bas chez celles-ci. Un total de six échantillons a été utilisé pour le séquençage d'ARN et des analyses bio-informatiques ont été effectuées. Plusieurs gènes et voies de signalisation ont présenté des différences entre les deux groupes d'animaux incluant le cycle cellulaire et la production d'hormones. Une confirmation des résultats par PCR en temps réel a été faite, mais la grande variation intragroupe a nui à l'obtention de résultats significatifs. Conjointement, une culture primaire de cellules de la granulosa a été réalisée pour évaluer l'effet des acides biliaires sur la stéroïdogénèse suite à la détection d'une plus grande quantité de ceux-ci chez la vache laitière. La présence d'acide biliaire dans la culture cellulaire cause une diminution de l'accumulation d'estradiol ainsi que de l'expression des gènes CYP19A1 et CYP11A1. Les résultats présentés dans ce mémoire indiquent une différence potentielle au niveau métabolique et moléculaire des follicules dominants entre la vache laitière et la génisse pouvant avoir une responsabilité dans la diminution de l'efficacité reproductive observée chez la vache laitière.

Mots clés : Follicule dominant; cellule de la granulosa; acide biliaire; stress métabolique; génisse; vache en lait; séquençage d'ARN

Abstract

Over the last fifty or more years, genetic selection has been employed to improve milk production in dairy cattle. This selection was made at the expense of reproductive performance. The observed decrease in fertility does not occur in heifers with the same genetic merit. The enormous milk production and the metabolic challenge that accompany it have a negative impact on the reproductive efficiency due to the metabolic stress of lactation. The purpose of the study was to gain a better knowledge of the molecular and metabolic difference between the two groups of animals in order to better understand the pathogenesis of infertility in dairy cows. To do this, the follicular wave of twelve lactating cows (30-50 days in milk; N = 12) and ten heifers (N = 10) were synchronized by ultrasound guided follicle ablation and by hormonal treatment with injection of prostaglandin-F2 α and insertion of a progesterone implant. Follicular fluid and granulosa cells of the dominant follicle were aspirated on day 6. The metabolic indicators BHBA, total bile acids, cholesterol and glucose, were measured in the animals from the blood samples also taken on day 6 confirming greater metabolic stress in the cows when compared to the heifers. A total of six samples were used for RNA sequencing and bioinformatics analyses were performed. Several genes and signaling and cellular function pathways were shown to differ between the two groups of animals, including the cell cycle signaling pathway and hormone production pathway. A confirmation of the results by real-time PCR was undertaken, but the great intragroup variation obviated significant results. In the second set of experiments, primary culture of granulosa cells was conducted to evaluate the effect of bile acids on steroidogenesis to further explore the larger amount of the bile acids in the dairy cows when compared to heifers. The results demonstrate a difference in the metabolic status of the animals; BHBA, total bile acids and cholesterol being higher and glucose being lower in the dairy cow relative to the heifer. Presence of bile acids in the granulosa cell culture caused a decrease in expression of *CYP19A1*, *CYP11A1* and estradiol accumulation. The differences at the metabolic and molecular level of the dominant follicles between dairy cows and heifers may be implicated in the reduced reproductive efficiency of the dairy cows.

Key words : Dominant follicle; Granulosa cells; Bile acids; Metabolic stress; Heifers; Lactating cows; RNAseq

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	2
Recensement des écrits.....	4
FERTILITÉ CHEZ LE BOVIN LAITIER.....	4
<i>LA GÉNISSE</i>	4
<i>LA VACHE LAITIÈRE</i>	5
<i>DIFFÉRENCE DE FERTILITÉ ENTRE LA GÉNISSE ET LA VACHE</i>	7
Stress métabolique	9
ORGANES REPRODUCTEURS FEMELLES	12
<i>L'OVAIRE</i> ,.....	12
<i>LE FOLLICULE</i>	14
<i>LES CELLULES DE LA GRANULOSA</i>	18
La stéroïdogénèse.....	18
La division cellulaire.....	19
LES ACIDES BILIAIRES.....	21
<i>GÉNÉRALITÉS</i>	21
<i>ACIDES BILIAIRES CHEZ LE BOVIN</i>	23
PROBLÉMATIQUE.....	26
Matériels et méthodes.....	28
1.0 Protocole <i>in vivo</i> avec les animaux	
ANIMAUX.....	28
PROTOCOLE DE SYNCHRONISATION ET COLLECTION DES ÉCHANTILLONS.....	28
Aspiration du follicule dominant.....	28

Prises de sang.....	29
ANALYSE BIOCHIMIQUE ET ENDOCRINIENNE.....	29
PCR EN TEMPS RÉEL.....	29
Analyse statistique.....	32
SÉQUENÇAGE D'ARN.....	32
Analyse bio-informatique.....	32
2.0 Protocole <i>in vitro</i> en culture cellulaire	
CULTURE CELLULAIRE	33
Traitement expérimental de la culture cellulaire.....	33
Dosage radio-immunologique.....	34
Analyse statistique.....	35
Résultats	36
1.0 <u>Protocole <i>in vivo</i> sur les animaux</u>	36
Niveau de BHBA, acides biliaires total, cholestérol et glucose dans le plasma et fluide folliculaire des génisses et des vaches en lactation.....	36
Séquençage d'ARN	38
Les processus biologiques	39
Les voies de signalisation	41
Les voies de signalisation KEGG	41
Les voies de signalisation PANTHER	42
PCR en temps réel.....	42
Gènes impliqués dans le cycle cellulaire	42
Gènes impliqués dans la stéroïdogénèse	44
2.0 <u>Protocole <i>in vitro</i> en culture cellulaire</u>	45
Niveau d'E2 dans le médium de culture	45
PCR en temps réel sur les gènes de la stéroïdogénèse	46
Discussion	47
Conclusion.....	53
Bibliographie.....	54
Annexes	xiv

Liste des tableaux

RECENSION DES ÉCRITS

TABLEAU 1 – Description et représentation de la morphologie des différents stades folliculaires.....14

MATÉRIEL ET MÉTHODE

TABLEAU 1 - Séquences aller et retour des amorces utilisées pour le PCR en temps réel....31

RÉSULTATS

TABLEAU 1 - Gènes régulés à la hausse pour les génisses et les vaches laitières impliquées dans les processus biologiques étant ressortis lors de l'analyse des gènes avec le programme Panther soit la régulation biologique, le processus cellulaire, le processus développemental et métabolique.....40

Liste des figures

RECENSION DES ÉCRITS

Figure 1 - Ligne du temps montrant la puberté jusqu'à la première lactation chez la génisse.....	5
Figure 2 - Taux de conception comparé entre les génisses et les vaches de la première, deuxième et troisième lactations. Adapté de Valour, 2014 (47).....	8
Figure 3 - Graphique représentant la différence entre l'énergie requise pour la production de lait (ligne noire pleine) et l'énergie provenant de l'alimentation (ligne noire pointillée). L'écart entre les deux courbes (portion hachurée) est à l'origine de la balance énergétique négative. Image de Kutches, 1983.....	11
Figure 4 - Image représentant le tractus reproductif de la vache. Image tirée de Meyer, 2015. (73).....	13
Figure 5 - Coupe transversal d'un ovaire schématisant les différentes structures pouvant s'y retrouver. Image adaptée de Marieb, 2001.....	14
Figure 6 - Schéma représentant les différents stades folliculaires et leurs réponses aux gonadotrophines. Image adaptée de Orisaka, 2009	16
Figure 7 - Représentation du cycle œstral de la vache avec le moment du pic de LH (en vert) et la courbe de progestéronémie (en bleu).....	17
Figure 8 - Représentation des étapes de la stéroïdogénèse dans les cellules de la thèque (gauche) et les cellules de la granulosa (droite). Image tirée de Lapointe, 2011.....	20
Figure 9. Schéma représentant la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol et montrant les deux principales voies de synthèse, soit la voie classique impliquant CYP7A1 (gauche) ou la voie alternative avec CYP27A1 et CYP7B1 (droite). L'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) sont conjugués à la glycine ou la taurine par les enzymes de conjugaison (BACS/BAT). Image adaptée de Chiang, 2009	23

RÉSULTATS

- Figure 1 - Concentration moyenne (\pm moyenne des erreurs standards) de BHBA, acides biliaires, cholestérol et glucose dans le plasma et le fluide folliculaire du follicule dominant des vaches en lactation et génisses37
- Figure 2 - A : Quantité de gènes exprimés différemment entre les génisses et vaches en lactation. B : 10 premiers des gènes avec expressions à la hausse pour les génisses avec le score phénotypique entre parenthèse. C : 10 premiers des gènes avec expressions à la hausse pour les vaches avec le score phénotypique entre parenthèse38
- Figure 3 - Graphique en pointe de tarte représentant les processus biologiques ayant des gènes différemment exprimés entre les vaches et les génisses39
- Figure 4 - Quantité relative d'ARN messenger provenant des cellules de la granulosa des follicules dominants des génisses (bandes noires) et des vaches laitières (bandes blanches) des gènes CCND2 (A), RB1 (B), CDKN2C (C), CDKN1A (D), CDKN1B (E), RBL2 (F), CDC25A (G) et PCNA (H)43
- Figure 5 - Quantité relative des niveaux d'ARN messenger pour les gènes CYP19A1 (A), 3 β -HSD (B), STAR (C) et CYP11A1 (D) pour génisses (bande noire) et les vaches laitières (bande blanche)44
- Figure 6 - Effet de l'ajout d'acide cholique (0.005 μ mol) sur la concentration d'estradiol dans le milieu de culture à différents temps ($P < 0.05$)45
- Figure 7. Quantité relative des niveaux d'ARN messenger pour les gènes CYP19A1 ($p < 0.05$) (A) et CYP11A1 ($p = 0.001$) (B)46

Liste des sigles et abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGNE	Acides gras non estérifiés
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BHBA	Acide bêta-hydroxybutyrique
CCND2	Cycline D2
CDK4/6	Kinase dépendante des cyclines 4 et 6
CDKN1A	Inhibiteur 1A des cyclines dépendantes des kinases
CDKN1B	Inhibiteur 1B des cyclines dépendantes des kinases
CDKN2C	Inhibiteur 2C des cyclines dépendantes des kinases
CIDR	Implant de synchronisation d'œstrus de la vache
CIP/KIP	Kinases inhibiteurs dépendantes des cyclines
COC	Complexe cumulus-oophorus
CYP11A1	Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol
CYP17A1	Stéroïde 17-alpha-monooxygénase
CYP19A1	Aromatase
CYP27A1	Stérol hydroxylase 27
CYP7A1	Alpha-hydroxylase 7 du cholestérol
CYP7B1	Oxystérol et stéroïde 7 alpha hydroxylase
E2F	Facteur de transcription
FAS-L	Ligand de la protéine transmembranaire de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale
FSH	Hormone folliculo-stimulante
FXR	Récepteur farnesoïde X
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GO	Ontologie des gènes

HNF4a	Facteur nucléaire 4 alpha des hépatocytes
HSD17B1	Hydroxystéroïde (17-bêta) déhydrogénase 1
HSD3B2	Hydroxy-delta5-stéroïde déshydrogénase, 3bêta et stéroïde delta-isomérase2
IGF-1	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline « Insulin-like growth factor 1 »
IM	Intra-musculaire
KEGG	Encyclopédie Kyoto des gènes et génomes
LH	Hormone lutéinisante
LRH-1	Récepteur homologue 1 du foie
LXR	Récepteur hépatique X
p21 ^{Cip1}	Protéine inhibitrice du cycle cellulaire 21
p27 ^{Kip1}	Protéine inhibitrice du cycle cellulaire 27
p57 ^{Kip2}	Protéine inhibitrice du cycle cellulaire 57
PCNA	Antigène nucléaire des cellules en proliférations
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
pRB	Protéine rétinoblastoma
RB1	Rétinoblastoma 1
RBL2	Protéine 2 ressemblant à rétinoblastoma
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SHP	Protéine d'hétérodimère courte
SLC10A2	Co transporteur iléal du sodium et des acides biliaires
STAR	Protéine régulatrice de la stéroïdogénèse « steroidogenic acute regulatory protein »
TGR5	Récepteur des protéines couplées des acides biliaires
TNF-a	Facteur de nécrose tumorale alpha

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de maîtrise Bruce Murphy pour m'avoir accueillie dans son laboratoire alors que je n'étais qu'une étudiante de première année en médecine vétérinaire. Merci d'avoir toujours été présent pour toutes mes interrogations et d'avoir fait de l'environnement de travail un endroit agréable et motivant.

Un remerciement particulier à Kalyne Bertolin qui a été présente pour moi, depuis mon arrivée au laboratoire, et même encore aujourd'hui. Mon passage dans le laboratoire n'aurait jamais été le même sans ta présence et ton soutien incroyable. Merci pour tout le temps passé à tenter de résoudre mes problèmes et à me conseiller.

Je ne pourrai jamais assez remercier Fanny Morin pour tout l'appui qu'elle m'a apporté. Beaucoup de projets n'auraient jamais pu avancer autant si Fanny n'avait pas été présente. Elle est toujours prête à donner de son temps et ce fut très apprécié de ma part. Merci beaucoup pour tout Fanny.

Merci à Marie-Charlotte Meinsohn pour son aide dans la correction et l'écriture de ce mémoire et à Hilda Morayma Guerrero Netro pour son aide grandement apprécié dans la culture cellulaire, la collecte des ovaires à l'abattoir et ses résultats pour les dosages d'estrogène en culture. Merci à Raj Duggavathi pour la collection primaire des échantillons et pour ses bons conseils tout au long de ma maîtrise. Un remerciement à Nicolas Gévry pour le séquençage d'ARN et son aide pour mon début dans le monde de la bio-informatique.

À toute l'équipe du laboratoire de Bruce et du CRRA, merci pour votre aide et de m'avoir guidée dans mon cheminement dans ce nouveau monde qu'était pour moi la recherche.

Un énorme merci à mes parents qui m'ont toujours encouragée dans mes études et mes projets. Ils m'ont toujours supportée dans mes choix et dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

Finalement, un merci à mes amis de médecine vétérinaire qui m'ont supportée et aidée énormément pendant cette maîtrise. Merci d'avoir pris le temps de venir voir mes séminaires malgré nos horaires chargés et de toujours avoir été présents. Un merci particulier à Jessica

Aymen qui m'a aidée dans la réalisation de mes séminaires, merci pour ton écoute et ta patience. Merci à Mireille Godbout d'avoir pris le temps de m'assister avec mes problèmes informatiques et qui m'a été d'une immense aide pour l'écriture de ce mémoire.

Introduction

Le secteur laitier constitue l'une des plus importantes filières agricoles au Canada (Valacta 2013). La production de lait au Québec représente plus de 30% des revenus laitiers totaux du Canada (lait 2014). Le temps de vie d'une vache en production laitière dépend de différents facteurs incluant ses performances reproductives. Une vache reste en moyenne trois ans en lactation dans un troupeau avant d'être réformée (Hare, Norman et al. 2006). Effectivement, le déclin de la fertilité est une des raisons les plus importantes de réforme dans les troupeaux laitiers (Brickell and Wathes 2011; Valacta 2013) ayant un immense impact économique sur l'industrie laitière (Inchaisri, Jorritsma et al. 2010).

L'importance de la fertilité dans les troupeaux laitiers s'explique par toutes les conséquences reliées à sa diminution. Une diminution du bien-être reproductif d'un troupeau affecte le nombre de veaux nés par année par vache, le nombre moyen de jours en production et l'intervalle vêlage-vêlage (Bouchard 2003; Roy 2008). Le cycle de production complet d'une vache en une année comprend une gestation de 280 jours, les derniers 60 jours constituent la période de tarissement lors de laquelle la vache n'est pas en production de lait. Suite à la parturition, il y a une période dite d'attente volontaire qui est une fenêtre de temps pendant laquelle aucun essai ne sera fait pour mettre la vache gestante. Cette période a une durée très variable entre les élevages, mais est normalement d'environ 45 jours. Suivant cette période, la détection de chaleur et l'insémination commencent dans le but idéal d'avoir une vache gestante à environ 90 jours post- partum. Plus l'insémination fécondante est retardée plus il y aura de pertes économiques. Ceci s'explique par le fait que la production maximale de lait survient dans les semaines suivant la mise bas pour ensuite diminuer graduellement jusqu'au prochain tarissement. Pour avoir le maximum de rentabilité, une vache laitière devrait idéalement avoir un intervalle de vêlage-vêlage qui se situe entre 386 et 405 jours (Valacta 2008), ce qui évite de trop retarder son prochain pic de lactation. Une étude de Valacta montre que les troupeaux qui dépassent cet intervalle de 405 jours perdent environ 3 à 5\$ par vache par jour (Valacta 2008).

Le déclin de fertilité est un problème multifactoriel qui implique la régie, l'environnement et la génétique (Walsh, Williams et al. 2011). La sélection génétique réalisée au cours des

dernières années, basée sur la conformation physique et la forte production laitière, s'est faite avec peu d'égard pour la fertilité (Pryce 2004; Kuhn, Hutchison et al. 2006). Effectivement, les performances reproductives ont chuté lors de cette même période (Walsh, Williams et al. 2011). Il est intéressant de noter que les génisses nullipares avec des caractéristiques génétiques similaires aux vaches laitières ont un taux de conception supérieur (Sartori, Haughian et al. 2004; Sartori, Bastos et al. 2010; Walsh, Williams et al. 2011). Le taux de conception correspond à la proportion des animaux inséminés qui auront un diagnostic de gestation positif. Plusieurs différences existent entre les vaches multipares et les génisses, que ce soit les hormones (Sartori, Rosa et al. 2002; Wolfenson, Inbar et al. 2004), les ovaires (Wolfenson, Inbar et al. 2004), le fluide folliculaire (Bender, Walsh et al. 2010) ou le statut métabolique. Chez la génisse, la balance énergétique négative et le stress métabolique sont de moindre importance lorsque les marqueurs de stress métabolique, soit les acides gras non-estérifiés ou les acides bêta-hydroxybutyrique, sont comparée (Pryce 2004). Certaines études ont montré que les animaux avec un stress métabolique moins important avaient une meilleure fertilité et reprenaient le cycle œstral normal plus rapidement au début de la lactation que les autres (Dubuc, Duffield et al. 2012). De plus, on a observé une disparité entre la composition du fluide folliculaire des génisses et celui des vaches (Bender, Walsh et al. 2010), mais peu d'études se sont penchées sur les différences moléculaires entre ces deux groupes d'animaux.

Hypothèses et objectifs

Nous proposons donc l'hypothèse que la balance énergétique négative et le stress métabolique associés chez la vache laitière altèrent négativement l'expression génique des cellules de la granulosa et le microenvironnement du fluide folliculaire dans le follicule dominant ce qui nuit à l'ovulation.

Les objectifs de cette étude seront, en premier lieu, de déterminer l'expression génique des cellules de la granulosa provenant du follicule dominant chez les génisses et les vaches en lactation, en commençant par l'expression globale des gènes évalués par séquençage d'ARN suivi d'une confirmation de l'abondance d'ARNm des gènes choisis par PCR en temps réel. En second lieu, le profil endocrinien et biochimique du plasma et du fluide folliculaire

provenant du follicule dominant d'une vague folliculaire synchronisée seront mesurés pour évaluer et confirmer la différence métabolique entre les vaches et les génisses ainsi que pour explorer les différences présentes dans le microenvironnement folliculaire de ce follicule dominant. Finalement, l'impact de la présence d'acide cholique dans le microenvironnement folliculaire sur les rôles et fonctions des cellules de la granulosa chez la vache laitière sera examiné.

Le but principal de cette étude sera donc d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'infertilité pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et tenter d'augmenter le succès reproducteur en se concentrant sur les altérations moléculaires présentes dans le follicule dominant durant un stress métabolique.

Recensement des écrits

FERTILITÉ CHEZ LE BOVIN LAITIER

LA GÉNISSE

Une génisse ou taure est une jeune vache n'ayant pas encore eu de veau. Les génisses sont les sujets de remplacement pour les vaches plus âgées qui ont terminé leur vie de production et qui sont retirées du troupeau. Les génisses qui entrent dans les troupeaux doivent idéalement avoir un bon potentiel de lactation. La lactation ne débute que lorsque la génisse donnera son premier veau. Elle sera alors considérée comme une vache primipare. L'âge auquel la taure donne son premier veau est très important (Perry 2012; Wathes, Pollott et al. 2014). Effectivement, puisque l'âge au premier vêlage marque le début de la rentabilité de la vache, il est plus avantageux pour le producteur que sa vache donne son premier veau sans trop de délais. L'âge idéal pour le premier veau est de 23 à 25 mois ce qui implique que le protocole d'insémination doit débiter vers l'âge de 15 mois (Gasser 2014) considérant que la gestation dure environ 280 jours (Silva, Wilcox et al. 1992). Cet âge optimal de première mise bas est rarement atteint par les producteurs, la moyenne au Québec étant d'environ 27 mois (Duplessis 2015). Un âge au premier vêlage trop élevé (>30 mois) ou trop bas (<22 mois) aurait un impact négatif sur la future production de lait (Wathes, Pollott et al. 2014). Une bonne gestion d'élevage et une nutrition adéquate sont essentielles pour assurer que la génisse atteigne un poids corporel suffisant pour le vêlage (Le Cozler, Lollivier et al. 2008). Pour avoir une fertilité optimale lors de la première tentative de conception, la puberté devrait être arrivée 4 à 6 semaines avant le commencement des saillies (Le Cozler, Lollivier et al. 2008; Wathes, Pollott et al. 2014).

La puberté est définie dans la littérature comme étant le premier moment où la génisse montre des signes de chaleurs simultanément à une ovulation potentiellement fertile (Gasser 2014; Wathes, Pollott et al. 2014). Le moment d'atteinte de la puberté est influencé par plusieurs facteurs, qu'ils soient environnementaux ou génétiques (Wathes, Pollott et al. 2014). L'arrivée de la puberté chez la génisse survient entre 8 et 13 mois d'âge dépendamment de la race, de la génétique et du poids corporel. Dans les troupeaux laitiers, les génisses sont

pubères à environ 12 mois (Wathes, Pollott et al. 2014). L'âge à la puberté est un indicateur positif de la production future de l'animal (Patterson, Perry et al. 1992). La puberté est le résultat de plusieurs événements incluant la maturation de l'hypothalamus et du tractus reproductif, le développement folliculaire (Rawlings, Evans et al. 2003), l'augmentation des pulsations de l'hormone lutéinisante (LH) (Wathes, Pollott et al. 2014), la diminution du rétrocontrôle négatif de l'estrogène et donc l'augmentation du niveau d'estrogène amenant à des signes physiques d'œstrus (Gasser 2014). Certains problèmes de santé, comme des problèmes respiratoires ou digestifs, peuvent affecter la vitesse de croissance des génisses et ainsi retarder leur puberté (Johnson 2011). Les génisses ont un taux de conception maximal de 64 à 71% entre 15 et 16 mois (Wathes, Pollott et al. 2014). Le taux de conception diminue ensuite pour atteindre 42% lorsque la génisse est âgée de 26-27 mois (Kuhn, Hutchison et al. 2006).

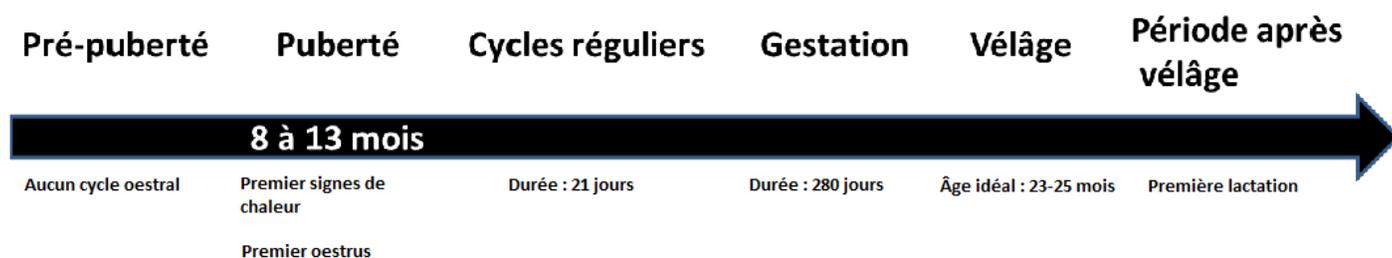


Figure 1. Ligne du temps montrant de la puberté jusqu'à la première lactation chez la génisse.

LA VACHE LAITIÈRE

Comme mentionné précédemment, la fertilité dans le cheptel laitier a diminué au cours des dernières années. La sélection génétique pour la forte production laitière était en partie responsable de ce problème, mais cette tendance génétique a récemment commencé à changer (Egger-Danner, Cole et al. 2015). La sélection génétique se base toujours sur l'amélioration de la production de lait, mais inclut aujourd'hui d'autres caractéristiques, telles que la longévité et la fertilité (Mark 2004; Egger-Danner, Cole et al. 2015). Les conséquences sur les

performances reproductives de nos vaches suite à la sélection génétique pour une augmentation de la production laitière sont par contre toujours visibles à ce jour. Partout à travers le monde, des études décrivent une baisse du taux de conception, une augmentation du nombre d'inséminations artificielles pour obtenir une gestation et donc une diminution globale de la fertilité (Butler and Smith 1989; Beam and Butler 1999; Jorritsma and Jorritsma 2000; Lucy 2001). La synchronisation des ovulations et les protocoles d'insémination artificielle à temps fixes sont des éléments importants dans la gestion de la reproduction de nos jours (Bisinotto, Ribeiro et al. 2014).

Différents facteurs peuvent affecter la fertilité chez la vache. Tout d'abord, une forte production laitière est associée à une diminution de la fertilité chez les bovins (Lucy 2001). Les vaches avec une plus forte production de lait sont plus sensibles aux maladies qui affectent à la baisse le taux de conception telles que la mammite (Sloth, Friggens et al. 2003), la rétention placentaire, les métrites/endométrites (Grohn and Rajala-Schultz 2000) et les boiteries (Collard, Boettcher et al. 2000; Hernandez, Shearer et al. 2001). Certaines de ces conditions sont associées directement avec une dysfonction ovarienne comme c'est le cas pour les pathologies utérines (Williams, Fischer et al. 2007). Suite à la mise bas, l'utérus doit se préparer à recevoir une nouvelle gestation. Cela se caractérise par une diminution de taille et de l'œdème de l'utérus, une élimination des liquides et une régénérescence tissulaire (Kamimura, Ohgi et al. 1993). Ce processus est connu comme l'involution utérine et dure environ 40 jours (Kamimura, Ohgi et al. 1993). Un défaut ou retard dans la fonction folliculaire aura une influence négative sur l'involution de l'utérus (Sakaguchi, Sasamoto et al. 2004). Toutes ces conditions diminuent potentiellement le nombre de cycles œstraux normaux lors de la reprise de la cyclicité suivant la mise bas rendant la période d'insémination plus difficile (Sakaguchi, Sasamoto et al. 2004). La première ovulation post-partum arrive en moyenne à la quatrième vague folliculaire suite à la parturition (Sakaguchi, Sasamoto et al. 2004) et les vaches ayant eu plusieurs cycles œstraux avant la période d'insémination sont associées avec un meilleur taux de conception (Thatcher and Wilcox 1973). Une reprise sans délai de l'activité ovarienne est associée à une meilleure fertilité chez les vaches en post-partum (Darwasha 1997).

La parité de la vache a également une influence sur son succès reproductif (Santos, Rutigliano et al. 2009). Une étude faite au Québec montre une association positive entre la parité de la vache et la chance que celle-ci devienne une « repeat breeder » (Bonneville-Hebert, Bouchard et al. 2011). Une vache « repeat breeder » est une vache qui cycle normalement et sur laquelle on a tenté, sans succès, plus de 3 inséminations (Levine 1999).

La nutrition et la gestion prépartum sont deux éléments essentiels influençant également le bien-être reproductif. Une mauvaise nutrition ou préparation à la mise bas amènent une perte de condition corporelle, soit une diminution de 1 point sur la côte de chair, suivant le vêlage qui est souvent associé à une balance énergétique négative (Pryce 2004). Cet état physiologique amène des changements endocriniens chez la vache (Walsh, Williams et al. 2011) et est associé à une diminution de la fonction immunitaire rendant l'animal plus sensible aux maladies discutées ci-dessus (Roche, Friggens et al. 2009). La balance énergétique négative sera discutée plus en détail dans la prochaine section.

DIFFÉRENCE DE FERTILITÉ ENTRE LA VACHE ET LA GÉNISSE

La baisse d'efficacité reproductive n'a affecté que les vaches multipares et non les génisses de même qualité génétique (Pryce 2004; Sartori, Bastos et al. 2010). Il y a effectivement une différence significative entre le taux de conception des génisses nullipares (60%) et celui des vaches multipares (39%) [Figure 2](Pryce 2004). Les différences présentes entre les deux groupes d'animaux s'avèrent donc intéressantes à investiguer.

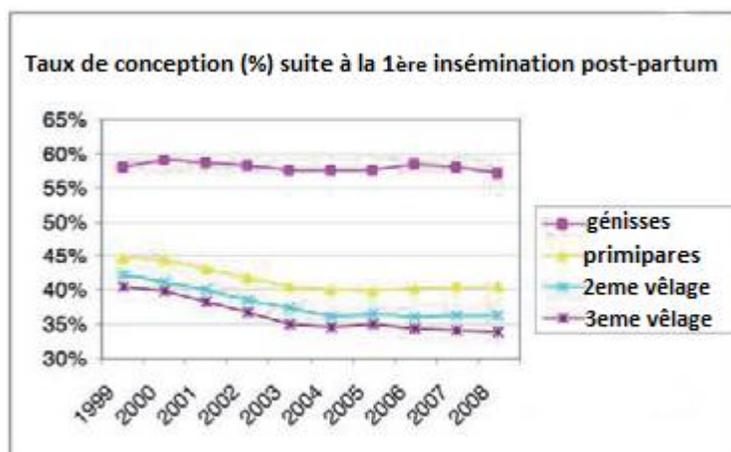


Figure 2. Taux de conception comparé entre les génisses et les vaches de première, deuxième et troisième lactation. Adapté de Valour, 2014 (Valour 2014).

En premier lieu, il est déjà connu que la balance énergétique négative et le stress métabolique, observés chez les vaches en début de lactation, sont de moindre importance chez la génisse (Pryce 2004). Cette balance négative est due à l'immense demande énergétique chez les vaches multipares, qui donnent un volume de lait plus important, en début de lactation (Collard, Boettcher et al. 2000; Butler 2005). Les animaux avec un stress métabolique de moindre importance ont une meilleure fertilité et reprennent un cycle œstral normal plus rapidement au début de la lactation que les autres (Dubuc, Duffield et al. 2012).

Plusieurs autres différences existent entre les vaches multipares et les génisses. Les vaches présentent un follicule dominant plus large, ce qui pourrait être le résultat d'une plus longue durée de la dominance folliculaire comparé à la génisse (Wolfenson, Inbar et al. 2004). Cette plus longue durée du follicule dominant pourrait être reliée au niveau d'œstradiol diminué chez la vache comparé à la génisse (Lopez, Satter et al. 2004; Sartori, Haughian et al. 2004). Le bas niveau d'œstradiol retarde l'ovulation. Cette hormone stimule l'axe hypothalamo-hypophysaire et sera responsable du pic de LH lorsque la stimulation sera suffisante (Roelofs, Lopez-Gatius et al. 2010). Le plus bas niveau d'œstradiol dans le sérum pourrait être expliqué par l'augmentation de la clairance métabolique du foie, suite à l'élévation importante de la consommation de matière sèche de la vache donnant une grande quantité de lait en début de

lactation (Sangsritavong, Combs et al. 2002). Ce phénomène de clairance hépatique explique également la concentration inférieure de progestérone observée chez la multipare (Sartori, Rosa et al. 2002; Sartori, Haughian et al. 2004). Le niveau diminué de progestérone peut également être relié au faible pic de LH présent avant l'ovulation chez la vache en lactation (Sartori, Rosa et al. 2002; Wolfenson, Inbar et al. 2004). Un niveau faible de pulsation de LH a été relié au stress métabolique et à la balance énergétique négative chez la vache, et puisque la LH agit sur le développement folliculaire une diminution de son niveau peut amener une dysfonction folliculaire (Diskin, Mackey et al. 2003). Une vache post-partum ayant eu plusieurs cycles œstraux normaux depuis la parturition, idéalement trois cycles, aura une augmentation de son niveau de progestérone et sera sujette à une meilleure chance de réussite suite à l'insémination (Butler 2005). De plus, les vaches laitières ont une plus forte incidence de double ovulation ce qui pourrait être associé au plus haut niveau de FSH présent chez la vache ce qui permet la croissance de plusieurs gros follicules (Sartori, Rosa et al. 2002; Wolfenson, Inbar et al. 2004). L'incidence d'anovulation est aussi plus élevée chez la vache laitière (Wiltbank, Sartori et al. 2011).

Les génisses et les vaches présentent également des variations des follicules. La composition en métabolites du fluide folliculaire du follicule dominant est différente entre les deux groupes d'animaux. Un groupe de recherche irlandais a identifié plus de 24 acides gras et 9 métabolites aqueux comme étant distincts (Bender, Walsh et al. 2010). Les acides gras saturés comme l'acide palmitique et l'acide stéarique étaient plus élevés chez la vache ayant possiblement un impact négatif sur la maturation de l'ovocyte (Bender, Walsh et al. 2010). Ces deux acides font partie des acides gras non estérifiés et ont été montrés, lors d'une expérience *in vitro*, comme ayant un effet négatif sur la prolifération et la survie des cellules de la granulosa (Vanholder, Leroy et al. 2005). Le microenvironnement folliculaire serait donc plus favorable chez les génisses ce qui pourrait contribuer à leur supériorité reproductive. Certaines études affirment que les changements de métabolites dans le sang se reflètent dans le fluide folliculaire et que ces changements métaboliques dans le micro environnement folliculaire pourraient affecter la qualité de l'ovocyte et des cellules de la granulosa (Leroy, Vanholder et al. 2004). D'autres groupes de recherche proposent plutôt que les métabolites

retrouvés dans le fluide folliculaire viennent effectivement en partie du sérum, mais seraient aussi directement sécrétés par les cellules folliculaires (Bender, Walsh et al. 2010). Le sujet de la disparité du micro-environnement folliculaire entre les génisses et les vaches laitières reste encore à être approfondi.

Description du stress métabolique

La période de lactation du bovin débute au moment du vêlage et la production de lait atteint son niveau maximum entre 4 à 8 semaines suivant la parturition (Walsh, Williams et al. 2011). Cette production s'accompagne d'une immense demande énergétique. Cette demande en énergie est en partie couverte par la consommation de nourriture. Cependant, le pic de consommation en matière sèche, et donc le niveau maximum d'énergie provenant de l'alimentation, survient après le pic de production en lait [Figure 3] (Butler 2005; Walsh, Williams et al. 2011). Les fonctions de lactation et de reproduction sont en conflit par rapport aux nutriments. Après la parturition, l'énergie et les nutriments seront dirigés vers la production de lait. Suite à l'écart présent entre la demande et la quantité disponible d'énergie, la balance requise est puisée dans les réserves corporelles de la vache qui entre alors en balance énergétique négative (Grummer 2007). Cette situation sera renversée au cours de la lactation lorsque la consommation de matière sèche donnera plus d'énergie que ce qui est requis pour la production laitière (Valour 2014).

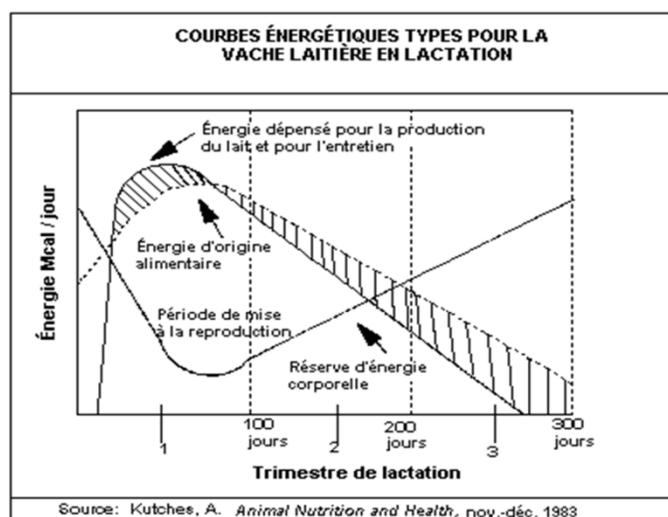


Figure 3. Graphique représentant la différence entre l'énergie requise pour la production de lait (ligne noire pleine) et l'énergie provenant de l'alimentation (ligne noire pointillée). L'écart entre les deux courbes (portion hachurée) est à l'origine de la balance énergétique négative. Image de Kutches, 1983.

La balance énergétique négative accompagnée du stress de la parturition et des changements endocriniens et physiologiques concomitants met l'animal dans un état de stress métabolique (Walsh, Williams et al. 2011). Le stress métabolique correspond en fait aux changements métaboliques qui accompagnent cette situation (Jorritsma, Wensing et al. 2003). Cette balance énergétique négative est associée à des changements dans le plasma. On peut observer une diminution de la concentration plasmatique d'insuline, de l'hormone Insulin like growth factor-1(IGF-1) (Lucy 2001; Shehab-El-Deen, Fadel et al. 2010) et de glucose (Butler and Smith 1989). La diminution de glucose serait due à la grande demande pour ce sucre lors de la production de lait et à la gluconéogenèse insuffisante (Leroy, Rizos et al. 2011). L'hypoinsulinémie, également présente, suite aux grandes demandes corporelles pour le sucre, exacerbe le déficit de gluconéogenèse (Leroy, Rizos et al. 2011). IGF-1 joue, quant à lui, un rôle important dans la prolifération des cellules de la granulosa ainsi que dans la production de progestérone et d'œstrogène (Lucy 2001; Jorritsma, Wensing et al. 2003). En temps normal, l'insuline et IGF-1 augmentent la réponse des cellules ovariennes aux hormones gonadotropes (LH et FSH) (Lucy 2008). Sans cette action synergique, le retour au cycle ovulatoire normal est retardé (Navarro, Leibush et al. 1999). La sécrétion d'un niveau adéquat des hormones gonadotropes (LH et FSH), essentiel pour la stimulation ovarienne, est retardée par les bas

niveaux de glucose et d'insuline (Butler 2005; Wathes 2012). L'activité ovarienne est supprimée, lors de la gestation, ce qui implique que l'ovaire doit reprendre son fonctionnement normal doit ré-entreprendre un développement folliculaire complet, avant de pouvoir permettre une nouvelle ovulation suite à la mise bas (Butler 2005).

Une vache en stress métabolique aura une augmentation d'acide gras non estérifié (AGNE) et éventuellement d'acide B-hydroxybutyrique (BHBA) (corps cétonique) dans son plasma (Laeger, Sauerwein et al. 2013). Trois principaux acides gras non estérifiés sont présents dans le plasma de la vache; l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique (Rukkwamsuk, Geelen et al. 2000). L'augmentation de AGNE indique une mobilisation des lipides provenant du tissu adipeux (Dubuc 2012). Ils produisent une source d'énergie alternative pour permettre au corps de sauver son glucose (Leroy, Rizos et al. 2011). Lorsque leur métabolisme sera excédé, l'oxydation de ceux-ci deviendra incomplète et c'est alors qu'il y aura une augmentation de la synthèse des corps cétoniques, dont le BHBA (Dubuc 2012). Les vaches avec les BHBA élevés sont dites en acétonémie et seront d'autant plus sensibles à une mauvaise reproduction et une baisse dans la production de lait (McArt, Nydam et al. 2013). La mobilisation des lipides n'est pas constante chez toutes les vaches, mais sera plus ou moins forte en fonction de l'état corporel à la mise bas et du niveau de production de lait (Valour 2014). L'augmentation des AGNE dans le sang amène une baisse de la sécrétion des gonadotropes et est associée à une période d'anoestrus prolongée en post-partum (Butler, Marr et al. 2003).

Le stress métabolique en début de lactation est reconnu pour causer une dysfonction ovarienne et aurait donc un effet négatif sur la reproduction (Chagas, Bass et al. 2007; Walsh, Williams et al. 2011). Les mécanismes de détérioration de ces fonctions ne sont pas encore complètement compris. Ces effets négatifs pourraient possiblement être dus à toute l'énergie qui est dirigée vers la production de lait (Chagas, Bass et al. 2007; Walsh, Williams et al. 2011). Une conséquence importante du stress métabolique est qu'il prédispose les animaux à plusieurs maladies en causant une déficience immunitaire comme mentionnée ci-devant (Roche, Friggens et al. 2009).

Physiquement, la balance énergétique négative sera visualisée comme une perte de condition corporelle (Butler 2005). Une perte d'état corporel amène un intervalle vêlage-vêlage et un intervalle vêlage-première ovulation plus longs (Butler 2005). Également une perte sévère de condition corporelle, suite au vêlage, amène une augmentation du nombre de jours nécessaire pour obtenir une vache gestante suite à la parturition (Lopez-Gatius, Yaniz et al. 2003).

En résumé, il est important, suite au vêlage, que l'ovaire, le foie et l'adénohypophyse reprennent leurs fonctions normales pour éviter un délai dans la reprise de la cyclicité normale (Butler, Marr et al. 2003; Butler 2005). Le contrôle de l'alimentation péripartum est essentiel pour tenter de diminuer l'impact de la balance énergétique négative (Pryce 2004).

ORGANES REPRODUCTEURS FEMELLES

L'OVAIRE

L'ovaire est un organe qui fait partie du système reproducteur femelle, il est trouvé en paire dans le tractus reproducteur et est responsable de la production des ovules (Lentz 2012). Ces structures, en forme d'amande, sont suspendues dans la cavité abdominale par le ligament large de part et d'autre de l'utérus. Chaque ovaire est également attaché à la corne utérine du même côté par le ligament propre de l'ovaire (Chung and Chung 2012).

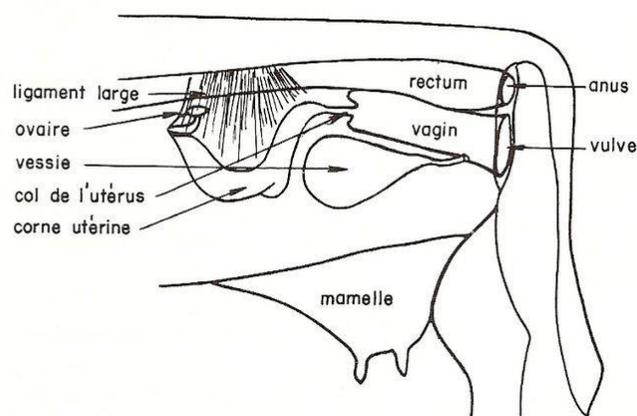


Figure 4. Image représentant le tractus reproducteur de la vache. Image tirée de Meyer, 2015. (Meyer 2015)

L'anatomie microscopique de l'ovaire permet la distinction entre deux sections différentes : le cortex, situé en périphérie, et la médulla qui forme la partie interne de l'ovaire (Chung and Chung 2012). Le cortex est recouvert par une simple couche de cellules épithéliales cuboïdes qui est appelée l'épithélium germinale (Clement 1987). Le cortex comprend le stroma dans lequel on retrouve les follicules et ovocytes à différents stades de développement. C'est aussi à cet endroit que l'on retrouvera le corps jaune suite à l'ovulation. La médulla comprend le stroma ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Junqueira, Carneiro et al.). Les ovaires ont deux fonctions principales; ils relâchent les ovocytes, processus connu sous le nom d'ovulation, et sont responsables de la production des hormones sexuelles femelles (Senger 2005).

LE FOLLICULE

Le follicule est l'unité fonctionnelle primaire de l'ovaire. Cette structure est essentiellement un ovocyte entouré de cellules de la granulosa et cellules de la thèque (Orisaka, Tajima et al. 2009).

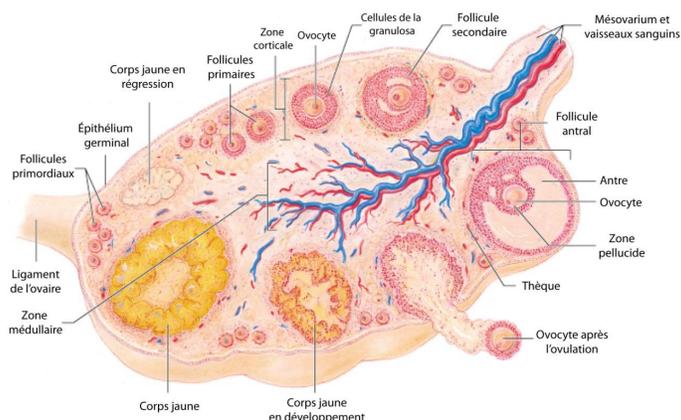


Figure 5. Coupe transversale d'un ovaire schématisant les différentes structures pouvant s'y retrouver. Image adaptée de *Marieb*, 2001 (Marieb 2001)

La folliculogénèse est le processus qui mène à la maturation du follicule ovarien. Lors de la naissance de l'animal, l'ovaire contient son nombre maximal de follicules primordiaux (Fortune, Yang et al. 2011). Plusieurs de ces petits follicules primordiaux sortiront de leur état de repos et progresseront pour devenir des follicules préovulatoires qui pourront potentiellement relâcher un ovocyte mûre ou subir l'atrésie. L'activation de ces follicules fait suite à plusieurs facteurs de régulation provenant de l'oocyte et des cellules de la thèque et de la granulosa (Binelli and Murphy 2010). La classification des différents stades folliculaires comprend, en ordre de développement, les follicules primordiaux, primaires, secondaires et antraux. Les différentes classes de follicules diffèrent par leurs réponses aux gonadotrophines (Scaramuzzi, Baird et al. 2011) ainsi que par leurs morphologies, un résumé des deux aspects est inclus dans le tableau 1 et la figure 6 respectivement. L'activation folliculaire qui correspond au passage du follicule primordial au follicule primaire ainsi que la formation du follicule secondaire a deux processus indépendants des gonadotrophines (Webb and Campbell 2007). L'activation folliculaire est plutôt contrôlé par des facteurs de croissances intra-ovarien (McNatty, Reader et al. 2007). Au début du stade antral, le follicule est alors réceptif aux gonadotrophines, mais n'est toujours pas dépendant de celles-ci (McNatty, Reader et al. 2007). Lorsque le follicule antral atteint un certain diamètre (environ 3 millimètres), il devient dépendant des gonadotrophines pour son développement vers une ovulation réussie (Binelli and Murphy 2010). Pour les fonctions reproductrices, l'activité et la régulation des hormones fonctionnent sous un système nommé l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadal (Matsui and Asami 2014). Tout d'abord, l'hypothalamus relâche l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) qui aura un effet sur l'adénohypophyse, plus spécifiquement sur les cellules gonadotropes (Flanagan, Millar et al. 1997; Charlton 2008). Ces dernières sécréteront à leur tour les gonadotrophines ou hormones gonadotropes soit l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (Parhar 2002). La LH et la FSH se rendront aux ovaires, par la voie sanguine, leurs permettant ainsi d'initier leur production d'œstrogène, d'inhibine, de progestérone et d'autres molécules. Les produits synthétisés par les ovaires auront alors une action de rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse, par exemple les hormones sexuelles ont un rétrocontrôle sur la production de GnRH (Clarke 2014).

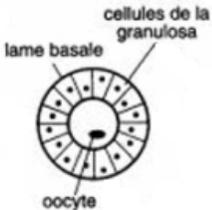
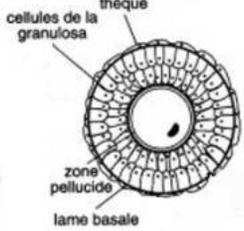
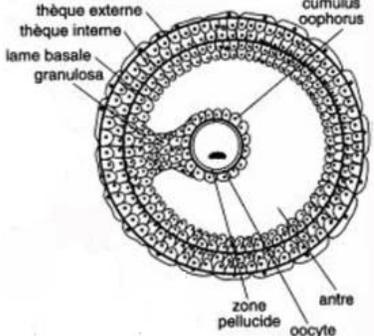
Stades folliculaires	Follicule primordial	Follicule primaire	Follicule secondaire	Follicule antral
<p>Morphologie</p>	<p>Simple couche de cellules squameuses de la granulosa entourant un ovocyte</p> 	<p>Simple couche de cellules de la granulosa (cuboïdes)</p> 	<p>Couches de cellules (>2) de la granulosa stratifiées (Sans antrum)</p> 	<p>Ovocyte entouré par cellules de la granulosa, formation de l'antrum et finalement entouré par les cellules de la thèque dans lequel on retrouve la vascularisation.</p> 

Tableau 1. Description et représentation de la morphologie des différents stades folliculaires. Image adaptée de Guénard et al. 1996

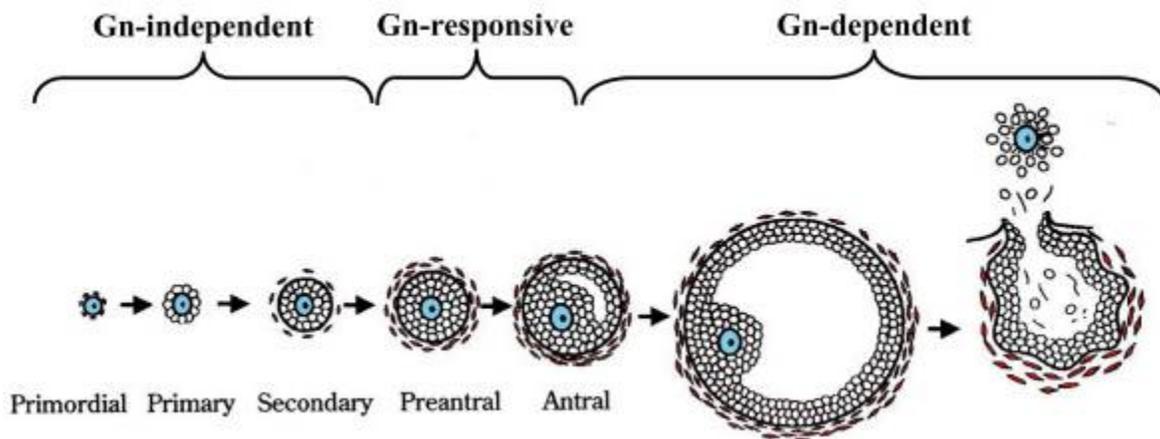


Figure 6. Schéma représentant les différents stades folliculaires et leurs réponses aux gonadotrophines. Image adaptée de Orisaka, 2009 (Orisaka, Tajima et al. 2009)

La majorité des follicules n'atteindront pas l'ovulation et subiront un processus dégénératif du nom d'atrésie sans qu'il y ait libération d'un ovocyte mature (Figueiredo, Hulshof et al. 1994). Le développement initial des follicules, qui correspond à la phase de recrutement, est stimulé par la FSH (Adams, Matteri et al. 1992). À ce moment, plusieurs follicules auront une phase de croissance commune. Suite à cette phase, il y aura sélection et dominance d'un follicule qui lui seul aura la possibilité d'ovuler. Cette dominance d'un seul follicule est particulière aux espèces monoovulatoires comme l'espèce bovine, équine ou humaine (Ginther, Beg et al. 2001; Senger 2005). Les autres follicules subiront tôt ou tard l'atrésie, ce sont les follicules subordonnés (Ginther, Kot et al. 1997). La raison de la régression de ces follicules est que le follicule dominant produit l'inhibine qui est une hormone qui fera diminuer la libération de FSH par l'hypophyse. La croissance des follicules n'étant plus stimulée, ils régresseront.

Ces différentes étapes se produisent continuellement chez la vache et ce phénomène est connu sous le nom de vague folliculaire. Les bovins ont des œstrus continus tout au long de l'année indépendamment des saisons. Le cycle œstral de la vache a une durée moyenne de 21 jours et comprend entre 2 à 3 vagues folliculaires (voir Figure 7). L'ovulation marque le début du cycle.

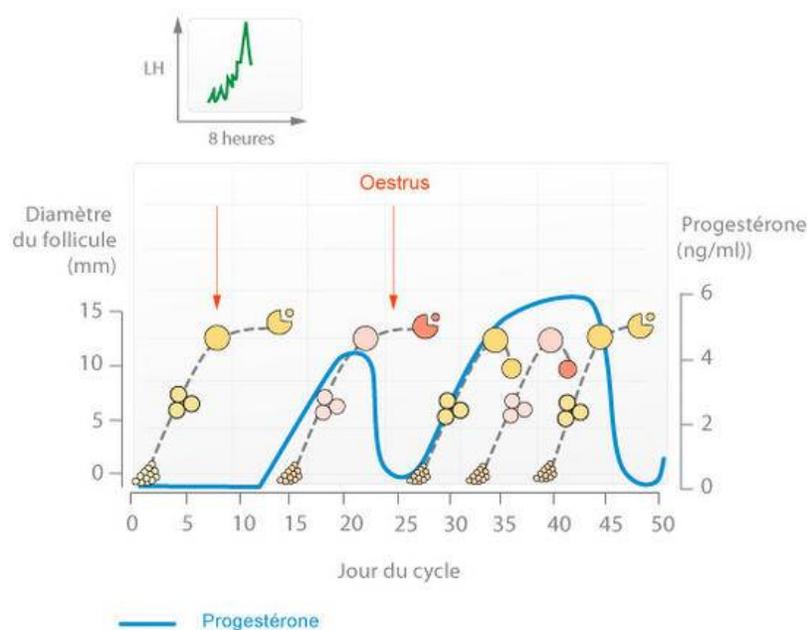


Figure 7. Représentation du cycle oestral de la vache avec le moment du pic de LH (en vert) et la courbe de progestéronémie (en bleu).

Le follicule dominant, ou follicule de Graaf, est le stade final de développement folliculaire. Ce follicule est compris dans la classe des follicules antraux, puisqu'il contient une cavité remplie de liquide appelé l'antrum ou cavité antrale. Le liquide contenu dans l'antrum est le fluide folliculaire qui constitue le micro environnement dans lequel se développe l'ovocyte. Il résulte de l'accumulation d'un transsudat plasmatique et de sécrétion des cellules de la granulosa (Hanzen CH. 2000). Les cellules de la thèque constituent plusieurs couches cellulaires. Ces cellules reposent sur une membrane basale. L'antrum contient également un épithélium stratifié de cellules de la granulosa et un complexe ovocyte-cumulus (COCs). Le follicule dominant sécrète l'estradiol et la quantité de cette hormone augmente avec la croissance du follicule. La sécrétion d'estradiol débute avec la synthèse de testostérone dans les cellules de la thèque interne. Le cholestérol est le précurseur de la testostérone. Les récepteurs de LH sont situés dans les cellules de la thèque et c'est la liaison de LH à ces récepteurs qui stimule la formation d'androgène (Drummond 2006; Orisaka, Tajima et al. 2009). Lorsque la FSH, provenant de l'adénohypophyse, se lie à ses récepteurs présents dans les cellules de la granulosa, la testostérone sera alors convertie en estrogène. La FSH aide également au développement des récepteurs de LH sur les cellules de la granulosa. L'augmentation de la sécrétion d'estradiol amène une hausse de libération de LH et lors de l'atteinte d'un niveau critique, l'effet de la LH sur ses récepteurs déclenche l'ovulation (Fortune, Rivera et al. 2004; Senger 2005). La conversion du cholestérol en estradiol est un processus nommé stéroïdogénèse qui sera discuté plus en détail dans les prochains paragraphes.

Le follicule dominant est le seul à avoir la possibilité d'ovuler. Lors de l'ovulation, il y aura rupture de la paroi folliculaire et de certains vaisseaux sanguins ce qui mènera à la formation du corps hémorragique. Ensuite, les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa subiront la lutéinisation ce qui produira une structure nommée le corps jaune. La LH est responsable de la lutéinisation des cellules de la granulosa. Le corps jaune est responsable de la production de la progestérone. Cette hormone permet à l'endomètre de se préparer pour une éventuelle gestation et est responsable du maintien de la gestation (Senger 2005).

LES CELLULES DE LA GRANULOSA

Les cellules de granulosa sont des cellules somatiques et sont subdivisées en cellules murales et cellules du cumulus (Matsuda, Inoue et al. 2012). Elles sont une composante majeure de l'ovaire ayant pour rôle la production des stéroïdes sexuels et la communication avec l'ovocyte pour assurer son bon développement.

La stéroïdogénèse

Tel que mentionné précédemment, la stéroïdogénèse est le processus qui mène à la formation des hormones stéroïdiennes (estradiol, estrone, estriol, progestérone, androstenedione). La production de ces hormones se fait principalement dans les ovaires chez la femelle. La liaison de la LH à son récepteur membranaire aux cellules de la thèque marque le début de la stéroïdogénèse. Le signal impliquera secondairement l'AMP cyclique et les protéines kinases A. Les hormones stéroïdiennes sont le résultat de la transformation du cholestérol. Le cholestérol arrive aux cellules de la thèque en provenance de la circulation par le biais des lipoprotéines de haute et basse densité. Le cholestérol est transporté à l'intérieur de la cellule et c'est à ce moment qu'il est pris en charge par la protéine STAR qui l'amène dans la membrane interne de la mitochondrie. C'est à cet endroit que le cholestérol est transformé en pregnenolone par l'enzyme CYP11A1 constituant la première étape limitante de la cascade (Miller and Auchus 2011). La pregnenolone sera ensuite transformée en androstenedione par les enzymes HSD3B2 et CYP17 pour se rendre ultérieurement dans les cellules de la granulosa. À partir de ce moment, c'est l'action de la FSH dans les cellules de la granulosa qui permettra le passage de l'androstenedione en estrone par l'enzyme CYP19A1, ou aromatasase, et finalement la formation de l'estradiol grâce à l'enzyme HSD17B1 (Lapointe and Boerboom 2011). Le follicule pré-ovulatoire a une aptitude supérieure d'aromatase de l'androgène par l'enzyme CYP19A1 ayant pour résultat un niveau plus élevé d'estradiol dans celui-ci (Drummond 2006). Un résumé des étapes de la stéroïdogénèse est inclus dans la figure 8.

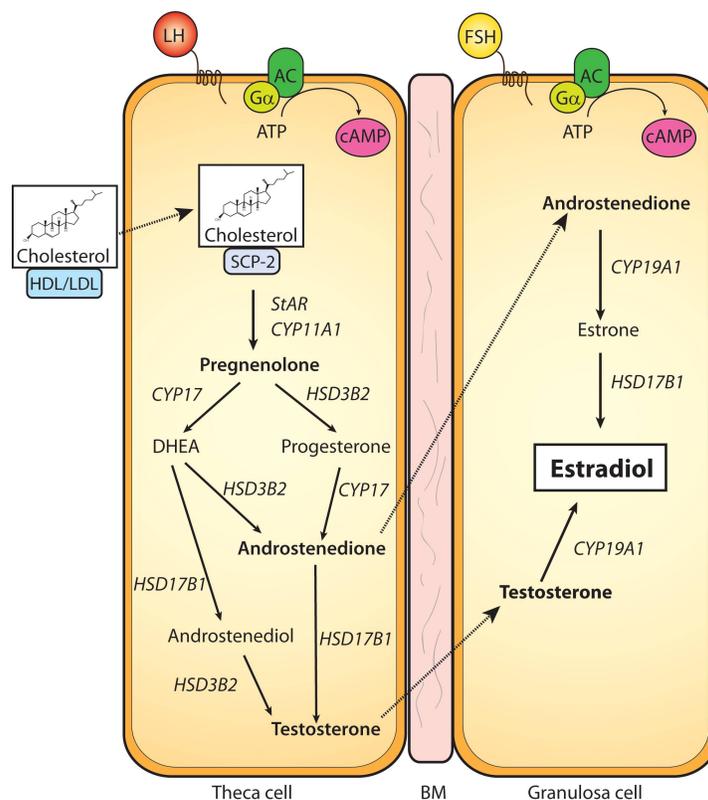


Figure 8. Représentation des étapes de la stéroïdogénèse dans les cellules de la thèque (gauche) et les cellules de la granulosa (droite). Image tirée de Lapointe, 2011 (Lapointe and Boerboom 2011).

La division cellulaire

En plus de leur rôle essentiel dans la production d'hormones sexuelles, les cellules de la granulosa doivent subir une bonne prolifération et différenciation pour permettre une croissance folliculaire adéquate qui pourra mener à une ovulation (Robker and Richards 1998). Une prolifération adéquate dépend de la progression dans le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est régulé par différents points de contrôle et le passage des cellules à travers ces contrôles est affecté en modifiant la cascade des kinases. L'entrée des cellules dans le cycle est encouragée par les cyclines D qui se lient aux kinases cyclines-dépendantes pour former un complexe permettant le passage de la cellule au travers du point de contrôle G1-S (Robker and

Richards 1998). La cycline D prédominant dans les cellules de la granulosa est la D2 alors que D1 et D3 se retrouvent dans les cellules de la thèque (Robker and Richards 1998). Ces complexes ont la capacité de phosphoryler certains substrats comme la protéine rétinoblastome (pRB). La pRB, normalement non phosphorylée, est liée au facteur de transcription E2F empêchant ainsi sa libération et bloquant la progression dans le cycle cellulaire qui reste en G1 (Sherr 1994). Lorsque la pRB est phosphorylée, elle libère E2F ce qui permet la progression à travers le cycle. À la fin de la phase G1, la formation du complexe cycline E-cdk2 sera nécessaire pour le passage à la phase S. La prolifération est augmentée de façon importante dans les follicules mûres (pré-antraux) qui répondent aux gonadotrophines et qui ont une production d'œstrogène. L'œstrogène agit comme protecteur de la progression des cellules de la granulosa dans le cycle cellulaire. Effectivement, lors d'une étude où les cellules ont été mises en culture avec de l'œstrogène, la susceptibilité à l'apoptose induite par Fas-L, une protéine transmembranaire donnant le signal de mort cellulaire, était diminuée (Quirk, Cowan et al. 2006). Certains inhibiteurs du cycle cellulaire tel que les inhibiteurs de cdk bloquent le cycle cellulaire en empêchant l'activité des complexes cyclines-cdk. La famille Cip/Kip des inhibiteurs (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}) empêche particulièrement l'activation des complexes cyclines D-cdk 4/6 et cycline E-cdk2.

Au moment de l'ovulation et donc sous l'effet du pic de LH, les cellules de la granulosa quittent le cycle cellulaire (Hirshfield 1991) et entrent dans leur phase de différenciation finale; la lutéinisation (Richards 1994). La sortie des cellules du cycle fait suite à l'augmentation des inhibiteurs (p27 et p21) et à la diminution de la cycline D2. (Robker and Richards 1998).

Comme mentionné précédemment, la plupart des follicules ne se rendront pas à l'ovulation et subiront l'atrophie. Les cellules de la granulosa et les différents facteurs qu'elles sécrètent sont essentiels à la survie folliculaire (Matsuda, Inoue et al. 2012). Il a été proposé que l'apoptose des cellules de la granulosa soit l'élément déclencheur de l'atrophie folliculaire. Les cellules de la granulosa subissent l'apoptose lors de deux situations : soit une privation de facteur de survie tel que IGF et œstrogène ou une stimulation par un « death ligand » (FAS-ligand, TNF- α) (Tilly, Kowalski et al. 1991). Les cellules de la granulosa sont plus sensibles à la mort lorsqu'elles sont en prolifération rapide, par exemple dans un follicule en croissance (Quirk,

Cowan et al. 2004). L'estradiol et IGF auraient un effet inhibiteur sur l'apoptose des cellules de la granulosa si les cellules sont incluses dans un cycle cellulaire normal (Quirk, Cowan et al. 2004). La susceptibilité des cellules à l'apoptose dépend également de leur niveau dans le cycle cellulaire, la phase G1-S étant la plus à risque (Quirk, Cowan et al. 2006).

ACIDES BILIAIRES

GÉNÉRALITÉS

Le moyen de catabolisme principal du cholestérol chez les animaux est réalisé par la synthèse des acides biliaires (Houten, Watanabe et al. 2006; Chiang 2009). Cette biosynthèse se produit dans le foie et nécessite plus de 17 enzymes différentes (Russell 2003). Il y a deux voies de synthèse d'acides biliaires primaires à partir du cholestérol. La première implique l'enzyme *CYP7A1*, enzyme qui constitue également l'étape limitante de synthèse dans cette voie, et est considérée comme étant la voie principale de synthèse des acides biliaires. La voie alternative engage les enzymes *CYP27A1* et *CYP7B1* (Agellon 2002; Russell 2003) [Figure 9]. Les deux acides biliaires primaires sont l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. La structure de ces acides primaires peut varier entre les vertébrés (Russell 2003). Ces acides primaires sont considérés comme étant cytotoxiques et seront éventuellement conjugués à un acide aminé (glycine ou taurine), ce qui les rendra plus amphipatiques et moins toxiques (Chiang 2009). Pour former les acides biliaires secondaires, les acides primaires devront être déconjugués et déhydroxylés dans l'intestin. Il y a plus de 20 acides biliaires différents dans le corps qui ont des actions et temps de vie divergents (Russell 2003).

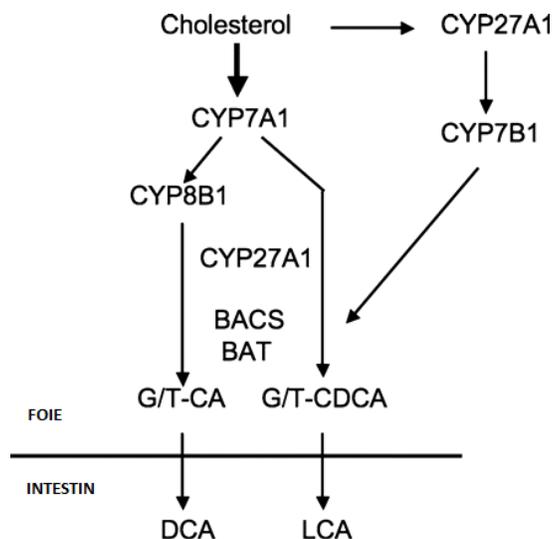


Figure 9. Schéma représentant la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol et montrant les deux principales voies de synthèses soit la voie classique impliquant CYP7A1 (gauche) ou la voie alternative avec CYP27A1 et CYP7B1 (droite). L'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) sont conjugués à la glycine ou la taurine par les enzymes de conjugaison (BACS/BAT). Image adaptée de Chiang, 2009 (Chiang 2009).

Les enzymes nécessaires à la formation des acides biliaires sont finement autorégulés par activation de récepteurs nucléaires nommés FXR (récepteur farnésoid X ou *NR1H4*) et LXR (récepteur X du foie). Ces deux classes de récepteurs ont des sous-unités alpha/beta et formeront un hétérodimère avec le récepteur d'acide rétinoïque (RXR) (Goodwin, Jones et al. 2000). Le récepteur FXR α joue le rôle de facteur de transcription et sera activé par l'intermédiaire des acides biliaires directement. Il permettra l'expression de son partenaire hétérodimère SHP qui inhibera les récepteurs nucléaires LRH-1 et HNF4, ce qui aura pour effet de diminuer la transcription de l'enzyme CYP7a1, et par conséquent la synthèse des acides biliaires (Houten, Watanabe et al. 2006; Chiang 2009). LRH-1 est connue comme ayant un effet positif sur l'expression de CYP7A1 (Goodwin, Jones et al. 2000) et HNF4 joue un rôle important dans l'homéostasie des acides biliaires (Inoue, Yu et al. 2006). Le récepteur LXR sera activé par le cholestérol ou ses métabolites et est quant à lui responsable d'une stimulation positive du catabolisme des acides biliaires (Jenkins, Hardie et al. 2008). La régulation de la synthèse des acides biliaires est un processus complexe qui n'est pas encore complètement élucidé à ce jour et ne sera pas décrit en détail dans cette revue de littérature.

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie et sont excrétés avec la bile dans le lumen intestinal où ils aident à la digestion et l'absorption des lipides (Agellon 2002). La grande majorité des acides biliaires seront récupérés dans les intestins et retourneront au foie via la circulation entérohépatique et seulement une petite partie des acides biliaires sera perdue et devra être de nouveau synthétisée (Agellon 2002; Russell 2003; Houten, Watanabe et al. 2006).

Les acides biliaires sont des régulateurs métaboliques et sont reconnus comme ayant plusieurs fonctions physiologiques primaires. En premier lieu, il s'agit d'un moyen d'excrétion dans les fèces et d'élimination de l'excès de cholestérol. La synthèse des acides biliaires est le produit final engendré par les mécanismes d'élimination du cholestérol (Javitt 1994). Ensuite, ils permettent de solubiliser le cholestérol dans la bile. Les acides biliaires ont une action émulsifiante qui facilite la digestion des triglycérides dans l'intestin grêle (Russell 2003; Nguyen and Bouscarel 2008). Finalement, ils facilitent l'absorption intestinale des vitamines liposolubles. Les acides biliaires entrent également dans le contrôle du métabolisme des lipides, du glucose et de la dépense énergétique (Chiang 2009; Lefebvre, Cariou et al. 2009; Baptissart, Vega et al. 2013). De plus, les acides biliaires agissent comme molécules de signalisation dans plusieurs voies différentes, par exemple l'AMPc, les PKC, les récepteurs muscariniques et ceux de la tyrosine kinase (Houten, Watanabe et al. 2006; Nguyen and Bouscarel 2008). Ils sont également le ligand du récepteur nucléaire farnésoid X receptor α (FXR α) et du récepteur membranaire TGR5 (Baptissart, Vega et al. 2013).

Comme discuté précédemment, les hormones stéroïdiennes proviennent également de la transformation du cholestérol. La synthèse de ces hormones consomme environ 10% du cholestérol actif par jour alors que la nouvelle production d'acides biliaires fait appel à la balance (Russell 2003).

ACIDES BILIAIRES CHEZ LE BOVIN

Chez la vache, la formation de micelle est essentielle pour la solubilisation des acides gras permettant ainsi leur absorption. Ce processus se fait à l'aide de la bile, mais également à l'aide des sécrétions pancréatiques (Bauman DE 2006). Les ruminants absorbent plus d'acides gras que les non-ruminants, conséquence d'une plus grande efficacité chez ces animaux (Bauman DE 2006). L'acide biliaire primaire retrouvé en majorité chez l'espèce bovine est l'acide cholique (Washizu, Tomoda et al. 1991) et l'acide conjugué majoritaire est celui lié à la taurine (Bauman DE 2006). Les vaches en début de lactation et qui donnent un plus grand volume de lait ont une plus forte concentration d'acides biliaires (Garry, Fettman et al. 1994). En début de lactation, le foie augmente passablement sa synthèse d'acide biliaire ce qui serait relié à l'augmentation de la production laitière et par conséquent à la plus grande demande en cholestérol et en triglycérides (Smith, Lear et al. 1998; Schlegel, Ringseis et al. 2012). L'enzyme *CYP7a1* et le récepteur $LXR\alpha$ augmentent dans le foie au cours des trois semaines précédant le vêlage et restent élevés quelques semaines suivant la parturition, ce qui concorde avec une augmentation de synthèse des acides biliaires (Schlegel, Ringseis et al. 2012).

Dans une étude comparant les vaches en lactation et les génisses, les concentrations des acides biliaires et du cholestérol dans le plasma et le fluide folliculaire provenant du follicule dominant ont été mesurées. Les concentrations d'acides biliaires et de cholestérol étaient plus élevées dans le plasma et le fluide folliculaire chez les vaches en lactation. Dans le même ordre d'idée, le récepteur membranaire TGR5 était en quantité supérieure dans le follicule dominant des vaches en lait ainsi que le transporteur d'acide biliaire SLC10A2. Il est suggéré que les acides biliaires systémiques ont la capacité de se rendre dans les ovaires et pourraient potentiellement affecter les cellules du follicule dominant. (Sanchez, Schuermann et al. 2014).

Le récepteur nucléaire $FXR\alpha$, qui a déjà été discuté précédemment, est retrouvé dans plusieurs organes différents. Le récepteur FXR est présent dans les testicules où il aurait un certain effet sur la production de stéroïdes. Ces effets inhibiteurs sont associés à la diminution d'expression des gènes *STAR*, *CYP11A1* et *3 β -HSD*, tous essentiels à la stéroïdogénèse. Ces

effets négatifs sur la production de stéroïdes se feraient via activation des SHP, ce qui inhiberait LRH-1 et SF1 qui sont deux récepteurs essentiels à cette voie de synthèse (Baptissart, Vega et al. 2013). Cette baisse de synthèse d'hormones sexuelles n'a pas été montrée chez la femelle. Cependant, il a déjà été démontré que les acides biliaires sont présents dans le fluide folliculaire des ovaires humains. Non seulement tous les enzymes des deux voies de synthèse et les récepteurs sont présents dans le follicule humain, mais la voie de synthèse a été montrée comme étant fonctionnelle (Smith, Nierstenhoefer et al. 2009). L'effet de la présence des éléments de la voie de synthèse des acides biliaires dans le follicule sur la stéroïdogénèse reste encore à être élucidé.

PROBLÉMATIQUE

En résumé, les génisses sont reconnues pour être plus fertiles que les vaches laitières de même mérite génétique. Plusieurs différences existent entre les vaches et les génisses que ce soit au niveau métabolique, ovarien ou endocrinien. Les vaches ont une production laitière plus volumineuse que les génisses, ce qui est associé à un stress métabolique en début de lactation. Le stress métabolique joue un rôle dans le mécanisme complexe de l'infertilité, ce qui concorde avec la différence de succès reproductif entre les génisses et les vaches. La grande production de lait amène une augmentation de la demande en cholestérol causant ainsi une augmentation de la synthèse des acides biliaires. Les acides biliaires ont été montrés comme ayant un effet négatif sur la stéroïdogénèse chez le mâle, mais l'effet chez la femelle n'a pas encore été investigué bien que l'on sache qu'ils sont présents dans le micro environnement folliculaire. La stéroïdogénèse est une des fonctions principales des cellules de la granulosa qui doivent également assurer une bonne division cellulaire et un développement normal de l'ovocyte. Le but de cette étude fut de comparer des génisses et des vaches laitières avec un statut métabolique et une efficacité reproductive différents en évaluant la différence dans l'expression génique des cellules de la granulosa et la composition du micro environnement folliculaire du follicule dominant. L'objectif était d'améliorer les connaissances des altérations moléculaires présentes dans l'ovaire lors d'un stress métabolique, ce qui permettrait

une meilleure compréhension des mécanismes menant à l'infertilité. Il fut aussi intéressant d'examiner l'effet du stress métabolique et de la présence des acides biliaires sur l'activité des cellules de la granulosa en utilisant une culture cellulaire primaire de cellules de granulosa

Matériels et méthodes

1.0 Protocole *in vivo* avec les animaux

Animaux

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par les comités d'éthique d'utilisation des animaux de l'Université de Montréal et de l'Université McGill. Les animaux étaient logés sur la ferme d'enseignement du campus McDonald de l'Université de McGill. Un total de 22 vaches a été utilisé pour cette étude. Les vaches en lactation ($n = 12$) étaient entre 30 et 50 jours en lait (44.69 ± 1.51 jour en lait) et avaient entre 3 et 5 ans. Les vaches étaient dans leur deuxième ou troisième lactation et étaient exemptes de maladie (ex. : fièvre de lait, mammite,..). Les génisses ($n = 10$) étaient nullipares et âgées entre 12 et 14 mois (12.95 ± 0.99 mois). Elles avaient une histoire de santé et un cycle œstral normaux.

Protocole de synchronisation et collection des échantillons

Le premier jour à la ferme était qualifié comme étant le jour 0. La sélection des animaux a été faite par détection d'un corps jaune fonctionnel à l'échographie transrectale. La même journée, tous les animaux ont subi l'ablation par aspiration échoguidée de tous les follicules plus grand que 5 millimètres de diamètre présents sur les ovaires pour permettre l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire. Tous les sujets ont également reçu une injection de prostaglandine (Lutalyse, 10mg, IM) dans le but de faire régresser les structures lutéinisantes présentes au moment de l'injection et ainsi aider à créer une nouvelle vague folliculaire. Un implant intravaginal de progestérone (CIDR) a été posé pour maintenir un niveau minimal de progestérone permettant ainsi le développement du follicule dominant sans son ovulation. La nouvelle vague folliculaire est prévue entre 36 et 48h suivant l'aspiration au jour 0. Une prise de sang a également été réalisée sur tous les animaux.

Au jour 3, les animaux ont subi une échographie transrectale ainsi qu'une prise de sang.

Aspiration du follicule dominant

Au jour 6, une prise de sang, un dessin des ovaires à l'aide de l'échographie transrectale (diamètre et position de tous les follicules) et l'aspiration du follicule dominant pour la

collection du fluide folliculaire et les cellules de la granulosa sont réalisés. L'implant de progestérone est retiré.

Le fluide aspiré a été centrifugé à 3000 rpm pendant 5 minutes et les cellules de granulosa ont ensuite été collectées. Elles ont ensuite été incubées dans un tampon (tampon permettant la lyse cellulaire des érythrocytes; 2,075 g NH₄Cl, 0,25 g KHC₃ et 5% EDTA dans de l'eau distillée) pendant 5 minutes.

Les cellules de la granulosa et le fluide folliculaire ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80C jusqu'à leur analyse.

Prises de sang

Les prises de sang étaient faites à partir de la veine coccygienne dans des contenants à pression négative héparinés (366450, Tubes de verre BD avec K3EDTA). Le plasma a été gardé à -80C jusqu'à l'analyse.

Analyse biochimique et endocrinienne

Les BHBA, les acides biliaires totaux et le glucose ont été mesurés dans le fluide folliculaire et le plasma à l'aide de kits (Randox Laboratories, Diazyme Laboratories et Randox Laboratories respectivement) en utilisant l'analyseur RX Monza (RX2901, Randox Laboratories). Le glucose a été mesuré par colorimétrie enzymatique (Genzyme cholestérol-SL).

PCR en temps réel

L'ARN a été extrait des cellules de la granulosa en utilisant un kit d'isolation (Directzol RNA miniprep, Zymo Research) selon les recommandations du fabricant. Pour chaque échantillon, la concentration totale d'ARN a été estimée à l'aide de la machine NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 100 ng d'ARN en utilisant un kit (iScript cDNA Synthesis kit, Biorad) selon les recommandations du fabricant. L'ADN complémentaire a été utilisé pour la réaction polymérase en chaîne en temps réel (Q-PCR) avec la machine CFX96TM (Bio Rad). Tous les PCR ont été réalisés en

triplicat et contenaient tous 7,5 µl de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio Rad), 3,5 µl de primers [3000 µM] et 4 µl de cDNA [1 ng/µl]. Les conditions du qPCR pour amplifier le produit impliquaient 30 secondes à 95°C suivi de 39 cycles à 95°C pour 15 secondes et 60°C pour 30 secondes.

Les gènes évalués sont les gènes participant au cycle cellulaire (CCND2, CDK4, CDK6, PCNA, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2C, RB1, RBL2) et à la stéroïdogénèse (CYP19A1, CYP11A1, STAR, 3β-HSD). Les primers ont été conçus à partir du navigateur PrimerQuest et NCBI-BLAST, ils sont listés dans le tableau 1. Ils ont été utilisés à une concentration finale de 3000 nM et ont tous été validés avec les courbes standards. PPIA (Peptidylprolyl isomerase A) a été utilisé comme gène de référence pour déterminer les quantités relatives d'ADNc.

Tableau 1. Séquences aller et retour des amorces utilisées pour le PCR en temps réel.

Amorces	Aller	Retour
PPIA	CATACAGGTCCTGGCATC	CACGTGCTTGCCATCAA
CCND2	GACAACCTCCATCAAGCCTCA	AGCTTGCGAAGGATGTGTTT
CDK4	AAGTGGTGGGACAGTCAAGC	TGGAGCACGATACCACAGTG
CDK6	TCCCCTCAACCAATTGAGAA	GACAGGGCACTGTATGCTGA
PCNA	CTTCGTCTCAGGCGTTCATAG	GAAGGACTGAGGAAAGTGAGC
CDKN1A	CCCATTTTCATTGCACTTTGAATAAC	CACATCTCCCAGACCCATATTT
CDKN1B	CAGAAGGCGTCAGACGTAAA	TCTTGGAGTCAGGGATATGTATTC
CDKN2C	GAACTGGTTTCGCTGTCATTC	AGGCAGGTTCCCTTCATTATC
RB1	GTCTCCCATGTATCTTTGGAAC	CGCACTGTGGCCTAGAAAATA
RBL2	CCCGTTGCCTTTGTGTAATTC	CACTCACACATTGCACACTAATC
CYP19A1	TCCTGCTGCTCACTGGATT	AACCTGCAGTGGGAAATGAG
CYP11A1	AGACTTGGAGGGACCATGTA	GGATGCCTGGGTAATTCCTAAA
STAR	TTTTTTCCTGGGTCCTGACAGCGTC	ACAACCTGATCCTTGGGTTCTGCACC
3β-HSD	CCGGATGAGCCTTCCTATTT	CGGTTGAAGCAAGGGTTATATTT

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel de statistique JMP (Version 5.0.1a. SAS Institute Inc.). La différence entre les vaches en lactation et les génisses nullipares a été obtenue par une analyse « two-way » des variances. Ensuite, le test LSMeans Contrast post hoc a été utilisé pour déterminer les différences entre les moyennes individuelles. Une différence significative était considérée lorsque le $p < 0.05$.

Séquençage d'ARN

L'ARN purifié des cellules de la granulosa, décrit précédemment, de trois vaches en lactation et trois génisses nullipares a été envoyé à l'Université de Sherbrooke (Nicolas Gévry) pour séquençage d'ARN. Le protocole de séquençage ainsi que la préparation des échantillons ont déjà été décrits dans la littérature (Waldbauer, Rodrigue et al. 2012). Un total de 250 ng d'ARN a été fragmenté par hydrolyse (40 mM Tris-Acetate, 125 mM KOAc, 37.5 mM MgOAc) et purifié à l'aide d'un kit (RNA clean, Zymon Research). Un adaptateur hybride a été lié au bout 5' et l'ARN a de nouveau été nettoyé pour enlever tous les fragments non liés. Cet ARN a ensuite subi une transcription renversée et l'ADNc a été amplifié par qPCR. L'ADNc résultant a été quantifié à l'aide du Bioanalyzer (2100, Agilent).

Analyse bio-informatique

Le séquençage s'est fait à partir d'un séquenceur Illumina Hi-Seq 2000. La grosseur des lectures est 50 paires de bases. Les fichiers FASTq ont été alignés au génome de référence *Bos taurus* (UMD3.1/*bos taurus*4.6.1.) en utilisant l'outil d'alignement Tophat/Bowtie (version 2.0.10, Bowtie version 2.1.0.0). Seulement les séquences correspondant au génome ayant un score de qualité > 10 ont été utilisées. Deux répliques ont été réalisées pour permettre

l'analyse des données. La quantité de transcriptions a été faite à l'aide de Cufflinks (version 2.1.1, Trapnell Lab). Le chevauchement des gènes présents dans les deux groupes d'animaux a été déterminé à l'aide du logiciel Venny (Version 2.0, CNB-CSIC) et est représenté à la figure 2. Finalement, l'analyse de l'ontologie des gènes a été réalisée avec le logiciel Ontologizer (Version 2.0. (Bauer, Grossmann et al. 2008)). La recherche des voies de signalisations affectées s'est faite avec le logiciel Panther (version 10.0, (Thomas, Kejariwal et al. 2006)) et KEGG (Kanehisa and Goto 2000).

2.0 Protocole *in vitro* de culture cellulaire

Culture cellulaire

Des ovaires de bovins adultes ont été obtenus à l'abattoir et transportés au laboratoire dans un contenant maintenu à 30°C dans du PBS contenant de la pénicilline (100 UI) et streptomycine (100 µg/ml). Les follicules avec un diamètre de 2 à 5 millimètres ont été aspirés pour en retirer les cellules de la granulosa. La solution aspirée est filtrée dans un filtre en mailles d'acier de taille 150 µm (Sigma-Aldrich, Canada). Ce type de culture permet de maintenir la sécrétion d'estradiol des cellules de la granulosa. La culture a été faite dans des plaques de 16 puits à raison de 4 puits de répliques pour un traitement. Chaque puit contenait 500 000 cellules dans 500 µl de médium (DMEM/F12) avec 10 mM de bicarbonate de sodium, 25 mM de tampon HEPES, 4 ng/ml de sélénite de sodium, de l'albumine de serum bovin (0.1%; Sigma–Aldrich), 100 U/ml de pénicilline, 10^{-6} M d'androsténédione et 10 ng/ml de FSH bovine (AFP5346D; National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA, USA). Les réactifs sont en provenance de Life Technologies Inc. La FSH est ajoutée à la culture à partir du deuxième jour seulement. Les plaques sont gardées dans un incubateur à 37°C et à 5% CO₂ pour un maximum de 6 jours (Guerrero-Netro, Chorfi et al. 2015).

Traitement expérimental des cellules en culture

Afin d'évaluer l'effet des acides biliaires sur la concentration de l'estradiol, 0.005 μmol d'acide cholique ont été ajoutés à la culture cellulaire au jour 5. La concentration d'acide cholique a été choisie à partir d'un essai de dosage (0.001 à 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$) fait préalablement dans nos laboratoires. Le dosage d'estradiol avait été fait à toutes les concentrations pour déterminer la concentration minimale qui avait un effet réducteur significatif sur l'accumulation d'estradiol. Le milieu et les cellules ont été récupérés aux temps 0, 6, 12, 48 et 72 h. La concentration d'estradiol sera alors déterminée à chaque temps par dosage radio immunologique.

Pour évaluer les effets des acides biliaires sur la stéroïdogénèse, de l'acide cholique (0,001 $\mu\text{Mol}/\text{ml}$) a été ajouté à la culture au jour 5 de la culture sauf pour le temps 72 où le traitement avec l'acide cholique a débuté au jour 3 de la culture. Le médium et les cellules ont ensuite été récupérés aux temps 0, 6, 12, 24, 48 et 72 heures. La concentration a été choisie selon des expériences antérieures du laboratoire. L'ARN des cellules de la culture a été extrait et purifié avec le kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN) selon les instructions du fabricant. L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 100 ng d'ARN en utilisant un kit (iScript cDNA Synthesis kit, Biorad) selon les recommandations du fabricant.

Dosage radio-immunologique

La concentration d'estradiol dans le milieu de culture a été mesurée à l'aide d'un dosage radio-immunologique. Le protocole a été décrit par Jiang and Price, 2012 (Jiang and Price 2012). La mesure a été faite en duplicata. Le fluide folliculaire (200 μl) et le plasma (200 μl) ont été amenés à un volume total de 500 μl avec du tampon (0,05 M de tampon phosphate, 0,9% NaCL et 0,1% de gelatine). L'anticorps (100 μl) et le traceur (E2, 100 μl , Perkin Elmer, Montreal, QC, Canada) ont été ajoutés à ce volume. Le traceur lié à l'anticorps a été séparé suite à l'ajout d'une préparation de charbon-dextran. Le coefficient de variation accepté était

de < 8% et la sensibilité de 0,80 ng/ml. Une dilution d'antigène froid (1.95-500 pg/tube) a été utilisée pour la courbe standard.

PCR en temps réel

L'abondance relative des gènes CYP19A1, CYP11A1, STAR et 3 β -HSD, tous impliqués dans la stéroïdogénèse, a été mesurée par PCR en temps réel. Le protocole est le même que celui décrit ci-haut et les amorces sont décrites dans le tableau 1.0.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 6). Les données sont exprimées selon la moyenne \pm moyenne des erreurs standards. Elles ont été analysées par un test Student non apparié et seulement les valeurs $p < 0.05$ sont considérées comme étant significatives.

Résultats

1.0 Protocole *in vivo* avec les animaux

1.1 Niveau de BHBA, acides biliaires totaux, cholestérol et glucose dans le plasma et fluide folliculaire des génisses et des vaches en lactation

Pour évaluer le niveau de stress métabolique et s'assurer de la différence entre les deux groupes, des analyses biochimiques ont été réalisées. Le niveau de BHBA dans le fluide folliculaire était significativement plus élevé chez les vaches que chez les génisses ($p < 0.03$) et avait une tendance à la hausse chez les vaches, lorsque mesuré dans le plasma ($p = 0.07$). La concentration totale d'acide biliaire était plus élevée chez la vache en lactation que chez la génisse dans le plasma ($p < 0.01$) et les fluides folliculaires ($p < 0.05$). Les mêmes résultats ont été vus avec la concentration totale de cholestérol qui était plus élevée chez la vache dans le plasma ($p < 0.003$) et les fluides folliculaires ($p = 0.002$). La quantité de glucose était plus élevée chez la génisse dans le plasma ($p < 0.05$) et dans le fluide folliculaire ($p < 0.01$).

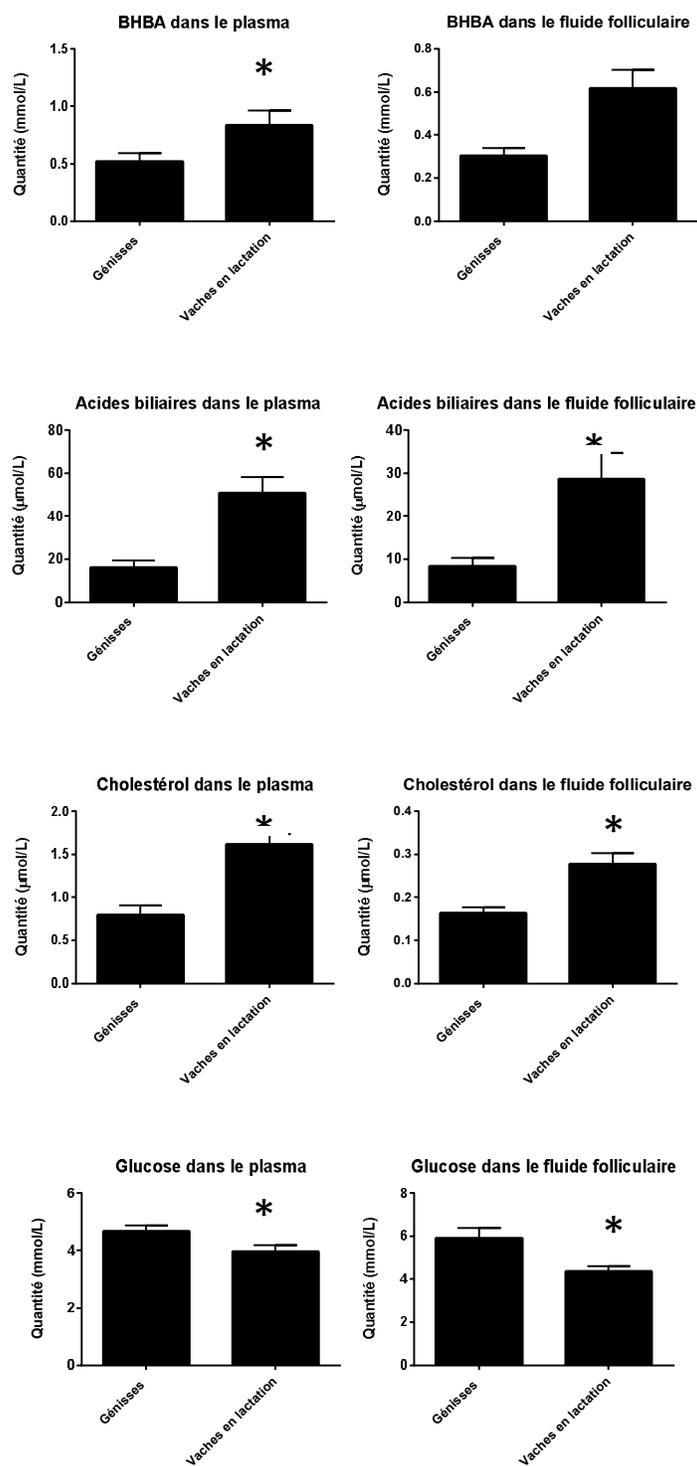


Figure 1. Concentration moyenne (\pm moyenne des erreurs standards) de BHBA, acides biliaries, cholestérol et glucose dans le plasma et le fluide folliculaire du follicule dominant des vaches en lactation et génisses. (*indique $p < 0.05$)

1.2 Séquençage d'ARN

Le séquençage de nouvelle génération a été utilisé pour analyser et comparer les transcriptomes de cellules de la granulosa des follicules dominants des génisses avec celui des vaches en lactation. À partir de la bibliothèque d'ADN complémentaire, une moyenne de 18,40 millions de lectures par échantillon a été générée. Les données brutes du séquençage d'ARN montraient 13 581 transcrits différents entre les deux groupes d'animaux. De ces transcrits, 4 070 gènes différents ($P < 0.05$, fold-change ≥ 2) entre les deux groupes ont été plus profondément évalués. De ces gènes, 108 et 135 gènes avaient une régulation à la hausse pour les génisses et les vaches en lactation respectivement. Ces gènes sont inclus dans un ou plusieurs termes GO.

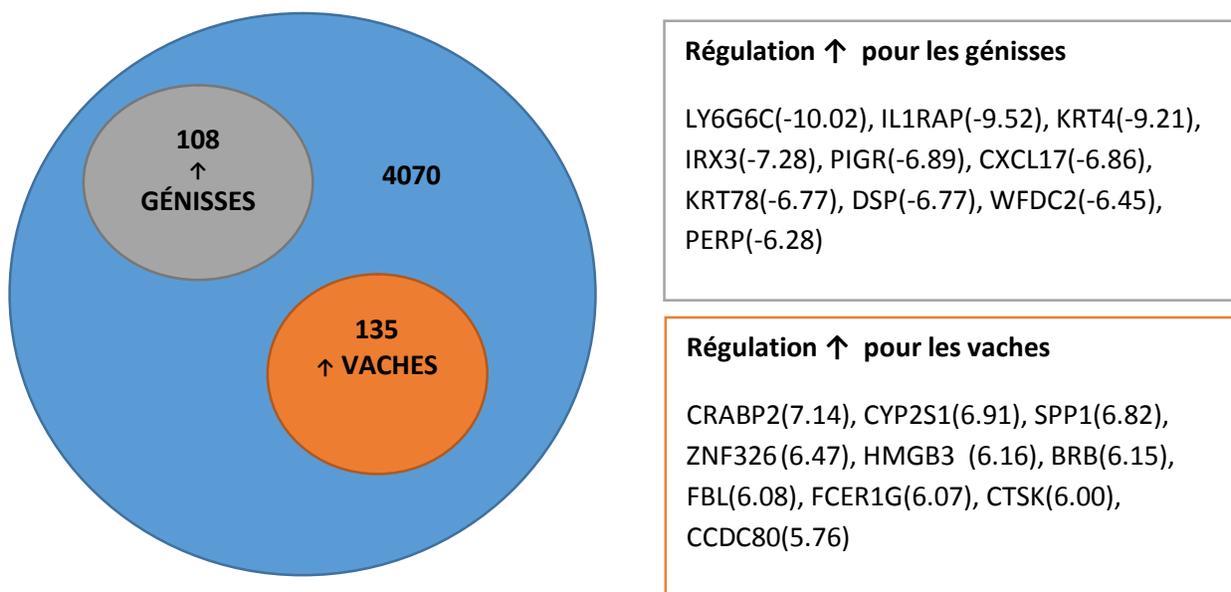


Figure 2. A : Quantité de gènes exprimés différemment entre les génisses et vaches en lactation. B : 10 premiers gènes avec expressions à la hausse pour les génisses avec le score phénotypique entre parenthèse. C : 10 premiers gènes avec expressions à la hausse pour les vaches avec le score phénotypique entre parenthèse.

Les catégories obtenues à partir de l'analyse GO comprennent les processus biologiques, les composantes cellulaires et les fonctions moléculaires. Ces différentes catégories permettent de faciliter l'analyse des données de séquençage et ainsi identifier les fonctions particulières affectées parmi les gènes ayant une expression différente entre les groupes. Certains outils de

« gene ontology » permettent également de visualiser si un ou plusieurs gènes d'une voie de signalisation particulière sont affectés.

1.2.1 Les processus biologiques

Les processus biologiques comprenant des gènes différemment exprimés entre les vaches et les génisses peuvent être visualisés dans le graphique en pointe de tarte provenant du programme Panther (Version 10.0).

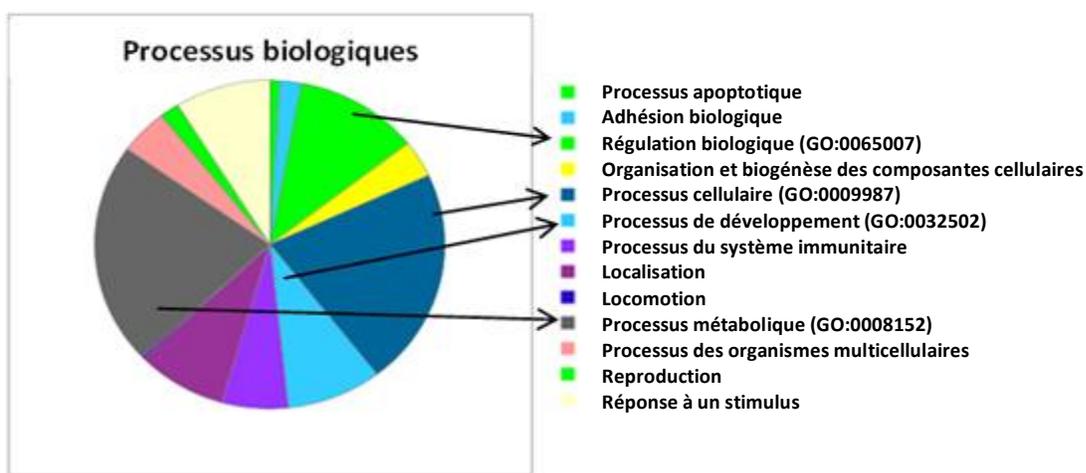


Figure 3. Graphique en pointe de tarte représentant les processus biologiques ayant des gènes différemment exprimés entre les vaches et les génisses.

Les 4 sections du graphique qui prédominent, sont la régulation biologique (GO : 0065007, vert fluo), processus qui inclut les processus homéostatiques (GO : 0042592), la régulation des processus biologiques (GO : 0050789) et la régulation des fonctions moléculaires (GO : 0065009). Deuxièmement, les processus cellulaires (GO : 0009987, bleu foncé) qui incluent la communication cellulaire (GO:0007154), le cycle cellulaire (GO:0007049), la prolifération cellulaire (GO:0008283) et le mouvement des composantes cellulaires (GO:0006928). Troisièmement, les processus développementaux (GO : 0032502, bleu pâle) (10.7%) qui incluent la différenciation cellulaire (GO : 0030154). Finalement, les processus métaboliques (GO : 0008152, gris foncé) qui incluent principalement les processus métaboliques primaires (GO : 0044238) [catégorie dans laquelle on retrouve le processus métabolique des carbohydrates, des aminoacides cellulaires, des lipides

(incluant le métabolisme des stéroïdes) et des protéines]. Les gènes régulés à la hausse pour les deux groupes d'animaux dans les processus biologiques affectés sont résumés dans le tableau 1.0.

Tableau 1.0. Gènes régulés à la hausse pour les génisses et les vaches laitières impliquées dans les processus biologiques étant ressortis lors de l'analyse des gènes avec le programme Panther soit la régulation biologique, le processus cellulaire, le processus développemental et métabolique.

Nom du processus biologique			Gènes à la hausse chez les génisses	Gènes à la hausse chez les vaches
Régulation biologique	Processus homéostatique		NUCB2, ATP1A1,	APOA1, COL1A2, COL1A1
	Régulation des processus biologiques		BCL2L1, MAPK3, ETV6, ELK1, IRX3, ATF3, PAQR8, MXD1, BCL3, TFDP1, FOSB, JUNB, PPRC1	APOA1, GATA3, SERPINB2, PDK3, PDLIM7, NR2C2, STK4, PHC2, GNAI2, EIF1AX, HDAC2
	Régulation des fonctions moléculaires		PI3, SPINT2, PHACTR4, A2ML1, WFDC2, PPM1K, PPRC1	APOA1, SERPINB2, PRKAG1, F5, A2M, MYH10, GNAI2, NAP1L1, DOCK6
Processus cellulaire	Communication cellulaire		GPR110, S100A2, GAB1, TSPAN1, S100A12, JUNB, P2RY2, GABBR1, UPK1B, MSLN, PAQR8, BCAM, S100A14, ANXA1, CFB, BCL2L1, DTX3, MAPK3, PHLDB3, SHROOM3, PPM1K,	VEGFA, PIP5K1C, COL1A2, SEMA6D, PDK3, CASQ1, DAB2, SPARC, PRKAG1, F5, NR2C2, STAB1, CCR1, STK4, MYH10, GNAI2, SV2A, DOCK6, ITGB2
	Cycle cellulaire		S100A2, S100A12, FOSB, JUNB, ATF3, S100A14, EMP2, MAPK3	VEGFA, MAPRE3, MCM7, ERCC4, NR2C2, CCR1, ZNF326, CDC25B, MYH10, PHC2, TUBA1A, NAP1L1, HDAC2
	Prolifération cellulaire			
	mouvement des composantes		MAPK3	TPM3, ASPM, FBLN1, PDLIM7,

	cellulaires			FSCN1, MYH10, DOCK6
Processus développemental	Différenciation cellulaire			APOA1
	Mort cellulaire			SCARB1, DAB2, NAP1L1, UBE2A1
Processus métabolique	Processus métaboliques primaires	Processus métaboliques des carbohydrates	SULF2, MAN2A2	ILVBL, ENO1, G6PC3
		Processus métaboliques des aminoacides cellulaires	ACSF2	ILVBL, PDK3, SHMT2, CAD
		Processus métaboliques des lipides	SULF2, ANXA1, ACSF2	APOA1, PIP5K1C, PRKAG1, NR2C2
		Processus métaboliques des protéines	ABHD14B, QSOX1, PI3, GAR1, SPINT2, A2ML1, WARS, MAN2A2, WFDC2, CFB, DTX3, MAPK3, PPM1K	APOA1, PDK3, CTSK, CTSZ, PRKAG1, ZMPSTE24, F5, A2M, CCR1, STK4, CDC25B, EIF1AX, UBE2Q1

1.2.2 Les voies de signalisation

1.2.2.1 Voies de signalisation KEGG

Selon les voies de signalisation KEGG, 24 gènes différemment exprimés à la hausse chez les génisses sont inclus dans au moins une voie de signalisation alors que 48 gènes sont impliqués dans différentes voies de signalisation chez les vaches en lactation. Les voies de signalisation affectées par l'expression différentielle des gènes entre les deux groupes d'animaux comprennent la biosynthèse du cholestérol (GO:0006695), la biosynthèse des hormones (GO:0046885), le cycle cellulaire (GO:0051726), les processus apoptotiques (GO : 0006915) et les processus métaboliques (GO:0008152). Les gènes associés aux voies citées ci-dessus sont listés dans l'annexe 1.0.

1.2.2.2 Voies de signalisation PANTHER

L'évaluation des 108 et 135 gènes régulés à la hausse pour les génisses et les vaches respectivement a également été réalisée avec le système de classification PANTHER. Pour les génisses, 29 voies de signalisation sont concernées par les gènes exprimés à la hausse et 30 le sont pour les vaches laitières. Toutes les voies de signalisation impliquées pour les génisses et les vaches laitières sont répertoriées dans les annexes 2 et 3 respectivement. Les voies de signalisation ressorties chez la génisse incluent l'apoptose, les facteurs de croissance, le système immunitaire et la voie insuline/IGF qui activent les protéines kinase et la cascade MAP kinase. Pour la vache, les voies comprennent la glycolyse et l'apoptose suite à la privation de glucose.

1.3 Q-PCR

La quantité relative d'ARN messager de 12 gènes différents a été évaluée par Q-PCR. Les gènes ont été choisis selon les résultats de l'analyse des termes GO selon la voie de signalisation dans laquelle ils étaient impliqués et selon la différence observée dans la transcription entre les deux groupes d'animaux.

1.3.1 Gènes impliqués dans le cycle cellulaire

Des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire ont tout d'abord été vérifiés. La cycline CCND2 et les cyclines dépendantes des kinases CDK4 et CDK6 ont toutes été évaluées. Les inhibiteurs CDKN1A, CDKN2C, CDKN1B, RB1, le régulateur négatif du passage de la phase G1 à S, RBL2, et finalement le marqueur de prolifération PCNA ont aussi été évalués. Les gènes CCND2 et RB1 ont une tendance à la hausse pour les génisses, mais la différence entre les deux groupes n'était pas significative. CDKN1A, CDKN1B et RBL2 avaient tous une tendance à la hausse chez les vaches, mais aucune différence n'était significative. CDKN2C, CDC25A et PCNA n'avaient pas d'expression différente entre les deux groupes d'animaux.

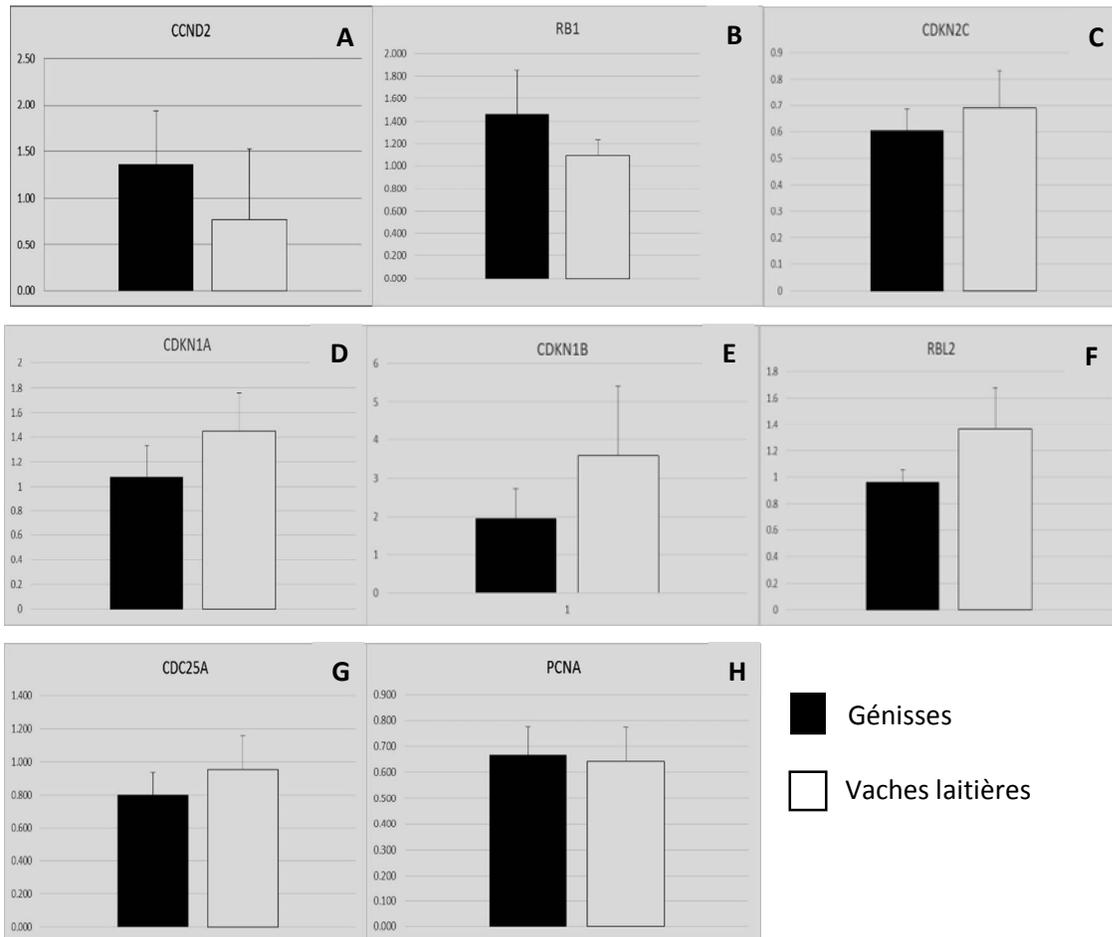


Figure 4. Quantité relative d'ARN messager provenant des cellules de la granulosa des follicules dominants des génisses (bandes noires) et des vaches laitières (bandes blanches) des gènes CCND2 (A), RB1 (B), CDKN2C (C), CDKN1A (D), CDKN1B (E), RBL2 (F), CDC25A (G) et PCNA (H). Aucune différence significative est observée.

1.3.2 Gènes impliqués dans la stéroïdogénèse

Ensuite, les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse ont été évalués; CYP19A1, CYP11A1, 3 β -HSD et STAR. CYP19A1, 3 β -HSD et STAR ont une tendance à la hausse pour les génisses, mais les différences dans l'expression des gènes ne sont pas significatives. Le gène CYP11A1 n'avait pas d'expression différente entre les deux groupes.

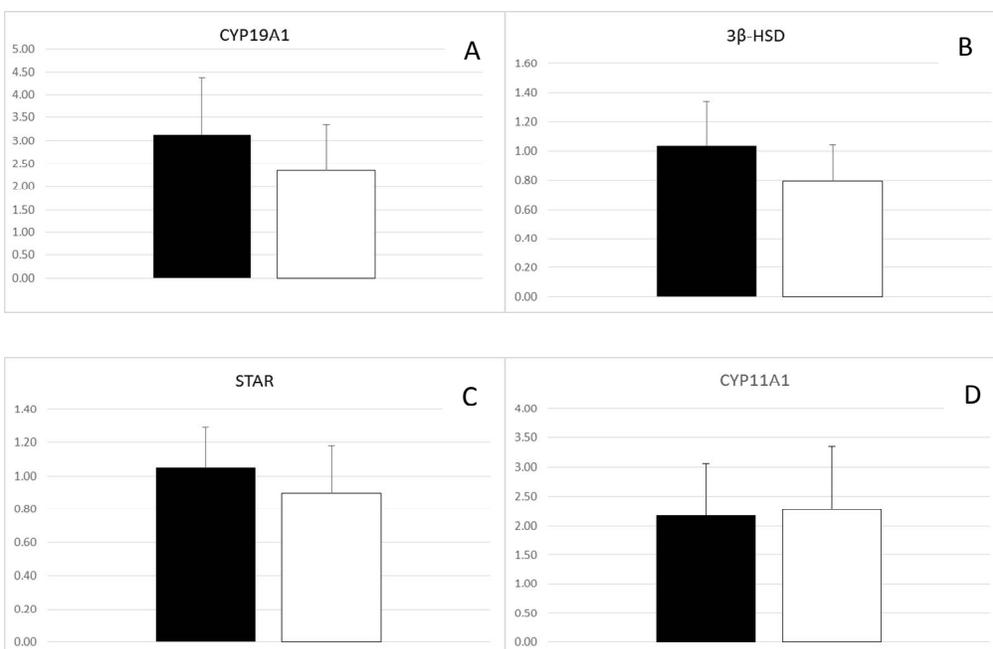


Figure 5. Quantité relative des niveaux d'ARN messager pour les gènes CYP19A1 (A), 3 β -HSD (B), STAR (C) et CYP11A1 (D) pour génisses (bande noire) et les vaches laitières (bande blanche). Aucune différence significative est observée.

2.0 Résultats de la culture des cellules de la granulosa

2.1 Quantité d'estradiol dans le médium

La culture cellulaire se fait dans un environnement sans sérum qui permet le maintien de la sécrétion d'estradiol au sein de la culture. L'ajout de 0.005 μmol d'acide cholique a montré une diminution de l'accumulation d'estradiol à 48 h (>50%) et à 72 h (>75%) ($P < 0.05$).

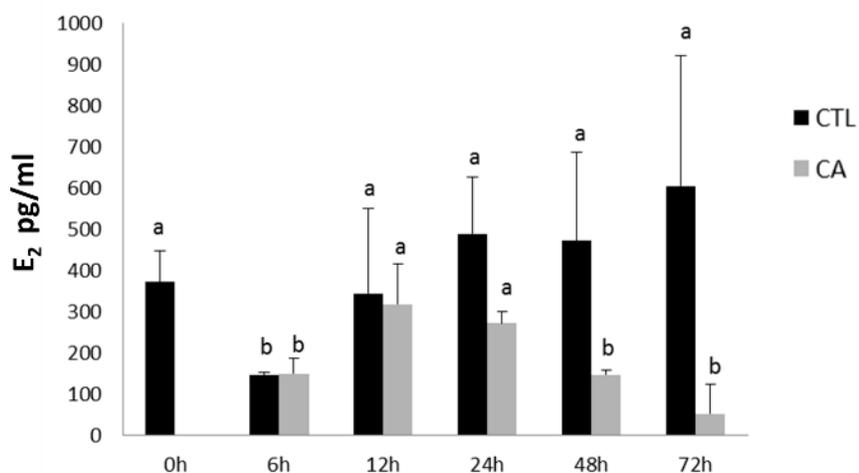


Figure 6. Effet de l'ajout d'acide cholique (0.005 μmol) sur la concentration d'estradiol dans le milieu de culture à différents temps. ($P < 0.05$). CA : Acide cholique, CTL : control.

1.2 Effet sur les gènes de la stéroïdogénèse

L'abondance d'ARN messager des gènes impliqués dans la formation d'hormones stéroïdiennes a été mesurée. La quantité de CYP19A1 était significativement réduite à 12, 24 et 48 h ($P < 0.05$). CYP11A1 avait une tendance à la diminution à 12 h et était réduit à 24 et 48 h ($P = 0.001$).

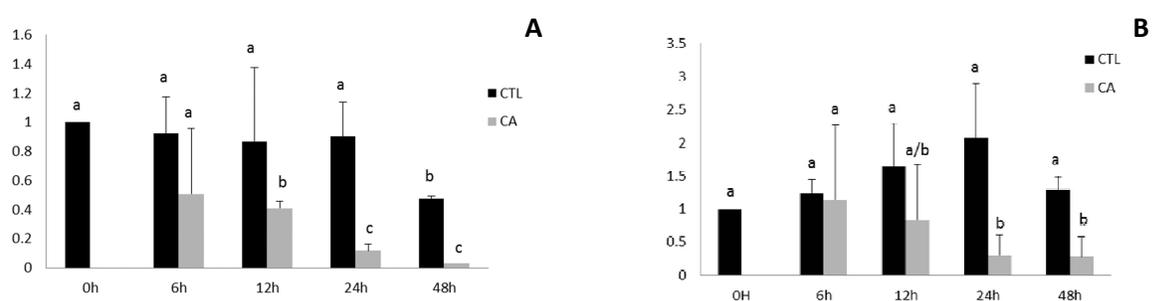


Figure 7. Quantité relative des niveaux d'ARN messager pour les gènes CYP19A1 ($p < 0.05$) (A) et CYP11A1 ($p = 0.001$) (B) suite au traitement de la culture avec l'acide cholique. CA : Acide cholique.

Discussion

Bien que le développement génétique nous ait amené des animaux ayant une production laitière exceptionnelle, le déclin de la fertilité qui a accompagné cette amélioration génétique est un sérieux problème dans l'industrie laitière actuelle. Quoique plusieurs autres éléments entrent en ligne de compte, comme la nutrition et la gestion des animaux, le stress métabolique amené par l'immense demande énergétique en début de lactation contribue largement au problème d'infertilité des vaches (Chagas, Bass et al. 2007; Walsh, Williams et al. 2011). Le taux de conception des génisses nullipares, qui ont un potentiel génétique similaire aux vaches plus âgées, n'a cependant pas subi cette même diminution (Sartori, Rosa et al. 2002). Il serait donc intéressant de mieux comprendre les différences des mécanismes moléculaires et biologiques, entre ces deux groupes d'animaux, qui pourraient avoir un impact dans le mécanisme d'infertilité.

Le moment de production maximale de lait dans un cycle de lactation complet se trouve au début de la lactation, soit environ dans les 4 semaines suivant la parturition (Butler 2005). Ce moment est associé à une balance énergétique négative et un stress métabolique chez la vache qui met toute son énergie dans la production de lait (Jorritsma, Wensing et al. 2003). Le reflet de ce statut métabolique est observé dans les changements des métabolites présents dans le corps de l'animal. Dans notre étude, l'acide β -hydroxy butyrique (BHBA) a une tendance à la hausse plus importante chez la vache laitière que chez la génisse dans le plasma et le fluide folliculaire. Le BHBA étant plus élevé chez les animaux en état de stress métabolique (Laeger, Sauerwein et al. 2013), cette différence de concentration indique une disparité métabolique entre les deux groupes d'animaux. Puisque le BHBA est le résultat d'un processus d'oxydation saturée des acides gras, leur augmentation indique une élévation de la mobilisation des lipides (Dubuc, Duffield et al. 2012), phénomène observé lors du pic de lactation chez la vache (McNamara and Hillers 1986). La production laitière nécessite également un immense apport en glucose. Effectivement, chez la vache, la majorité du glucose présent est utilisé pour la production laitière et les quantités disponibles sont donc diminuées (Leroy, Rizos et al. 2011). Ceci est en accord avec le fait que le niveau de glucose soit plus faible, dans le plasma et le fluide folliculaire, chez la vache comparé aux génisses dans notre

expérience. La baisse du glucose chez la vache est aussi en corrélation avec un statut métabolique divergent entre les vaches et les génisses (Beam and Butler 1999).

Une autre disparité présente entre les génisses et les vaches laitières se retrouve au niveau des quantités d'acides biliaires et de cholestérol présents dans le corps de ces animaux, les niveaux étant plus élevés dans le plasma et le fluide folliculaire des vaches. Ces résultats concordent avec le fait que la forte production laitière cause une demande élevée en cholestérol menant ainsi à une augmentation de la synthèse des acides biliaires par le foie (Schlegel, Ringseis et al. 2012). Effectivement la synthèse des acides biliaires consiste en la méthode principale de catabolisme du cholestérol, il est donc logique que ceux-ci soient augmentés lorsque le corps augmente son utilisation de cholestérol (Chiang 2009).

Le fluide folliculaire du follicule dominant reflète les métabolites qui sont en circulation (Leroy, Vanholder et al. 2004). Ceci explique que les résultats obtenus dans le plasma et le fluide folliculaire dans un même groupe d'animaux ont le même rapport, lorsque comparé à l'autre groupe d'animaux. Ces métabolites sont suspectés comme ayant un effet, possiblement délétère, sur les fonctions des cellules de la granulosa (Vanholder, Leroy et al. 2005). Certaines études ont montré que les bas niveaux de glucose et les hauts niveaux de BHBA affectent négativement le développement des ovocytes (Clark, Stokes et al. 2011; Sarentonglaga, Ogata et al. 2013). Malheureusement peu d'études sur les effets directs des changements métaboliques dans le microenvironnement folliculaire sur les fonctions des cellules de la granulosa sont à ce jour dans la littérature. Le but de notre étude était donc de tenter d'approfondir les connaissances sur ce sujet.

Dans cette étude, le processus de séquençage d'ARN s'est fait dans un but exploratoire. Nous voulions orienter notre recherche de gènes avec cette technique et ainsi pouvoir cibler ceux qui feront l'objet d'une recherche plus approfondie. Bien sûr, certains gènes ont été spécifiquement recherchés en se basant sur la littérature, mais le but était de trouver de nouveaux gènes ou des voies de signalisation différentes entre les groupes qui pourraient potentiellement avoir un effet dans la différence de fertilité. L'analyse des résultats de séquençage d'ARN montre plus de 4 070 gènes ayant une expression différente entre les

vaches en lactation et les génisses. De ces gènes, 108 et 135 gènes étaient considérés comme ayant une expression significativement augmentée pour les génisses et les vaches respectivement. Lors de l'analyse GO de ces gènes, il est intéressant d'observer que les processus biologiques affectés par les gènes différentiellement exprimés sont les processus cellulaires et les processus métaboliques. Les processus cellulaires incluent, entre autres, le cycle et la prolifération cellulaires alors que les processus métaboliques impliquent les processus métaboliques des lipides et stéroïdes. L'implication de ces gènes dans les voies de signalisation KEGG affecte plusieurs voies différentes, les plus intéressantes étant le cycle cellulaire et la biosynthèse du cholestérol et des hormones.

Suite à l'exploration des résultats de séquençage d'ARN, différents gènes ont été sélectionnés et utilisés pour obtenir une confirmation de l'expression différente par la technique de Q-PCR. En premier lieu, les gènes étant impliqués dans la progression du cycle cellulaire ont été investigués. Une bonne prolifération des cellules de la granulosa affecte le développement du follicule dominant (Robker and Richards 1998; Shimizu, Hirai et al. 2013). Chez les génisses avec un cycle œstral normal, le plasma a un effet stimulateur sur la prolifération des cellules de la granulosa, lorsque comparé à des génisses sans cycle normal (Spicer, Bossis et al. 2008). De plus, il est déjà connu que IGF-1 augmente la prolifération cellulaire dans les cellules de la granulosa in vitro (Spicer, Alpizar et al. 1993). Dans notre étude, les niveaux d'IGF-1 étaient significativement plus élevés dans le plasma et le fluide folliculaire des génisses comparés aux vaches en lactation (résultats non montrés ici). En se basant sur la littérature et le fait que les gènes présents dans la voie de signalisation du cycle cellulaire ont été identifiés comme ayant une expression différente lors de l'analyse ontologique des gènes, on peut poser l'hypothèse que les gènes encourageant la progression du cycle cellulaire et une bonne prolifération soient augmentés chez les génisses alors que les inhibiteurs du cycle ou les régulateurs négatifs seront à la hausse chez les vaches en lactation. Les résultats des niveaux d'expression des gènes obtenus par la technique de Q-PCR semblaient en accord avec notre ligne de pensée, mais malheureusement, aucun résultat ne s'est avéré significatif.

En second lieu, les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse ont été explorés. Les vaches en lactation ont un niveau d'estradiol inférieur aux génisses (Sartori, Haughian et al. 2004). Ceci

peut être expliqué par plusieurs hypothèses. La formation des hormones stéroïdiennes pourrait être diminuée suite à un défaut d'activation ou une déficience dans la transcription de certains gènes importants dans la stéroïdogénèse. Le gène STAR, qui a comme rôle de transférer le cholestérol dans la mitochondrie, a une expression diminuée chez les vaches en balance énergétique négative (Walsh, Mehta et al. 2012). Une autre possibilité serait un manque de substrat pour la production des hormones, mais ceci est peu probable puisque, comme observés dans les résultats, les niveaux de cholestérol (précurseur des hormones stéroïdiennes) sont plus élevés chez la vache que chez la génisse. Finalement, il est possible que le métabolisme des hormones stéroïdiennes soit augmenté, ce qui expliquerait les niveaux corporels diminués (Wiltbank, Lopez et al. 2006). Puisque la production des hormones est une voie de signalisation qui est ressortie lors de l'analyse des voies de signalisation KEGG, certaines enzymes clés de la formation des stéroïdes ont été investiguées. CYP19A1, STAR et 3 β -HSD montraient, comme suspectés, une tendance à l'augmentation pour les génisses qui ont des niveaux d'estradiol plus élevés que l'autre groupe d'animaux, mais les différences entre les deux groupes ne sont pas significatives à cause de la trop grande variabilité entre les échantillons. Étonnement, CYP11A1 ne montrait aucune différence entre les deux groupes.

Les variations de résultats au niveau du PCR en temps réel se retrouvaient dans l'expression des gènes investigués, mais aussi dans les gènes qui sont exprimés d'une façon constitutive i.e. les gènes « housekeeping ». Un gène « housekeeping » devrait être maintenu à un niveau constant d'expression dans les tissus permettant ainsi la normalisation des résultats obtenus avec la technique PCR (Rekawiecki, Rutkowska et al. 2012; Kozera and Rapacz 2013). Le niveau de ce gène ne doit en aucun cas être affecté par les techniques expérimentales. La normalisation des résultats à l'aide de ce gène permet d'éviter les erreurs dues à la variation des quantités d'ARN dans les échantillons et les variations suite aux protocoles d'extraction (Huggett, Dheda et al. 2005). Dans notre expérience, un des plusieurs gènes de référence utilisé est PPIA qui est considéré comme étant un gène de normalisation très stable même lorsque comparé à GAPDH qui est un gène de référence très populaire (Feroze-Merzoug, Berquin et al. 2002). Plusieurs problèmes peuvent être responsables des variations obtenues dans nos résultats. Tout d'abord, on connaît deux types de variations : technique et

biologique. Les variations techniques sont associées aux manipulateurs et aux protocoles de laboratoire. Ces variations sont celles sur lesquelles il est possible d'avoir un certain contrôle et peuvent arriver à plusieurs niveaux entre la collection des échantillons et le qPCR en tant que tel. Effectivement, la première manipulation de l'expérimentation qui consiste en l'aspiration échoguidée des follicules dominants peut faire l'objet de certaines erreurs. Bien que la technique soit approuvée pour la collection du fluide folliculaire et des cellules de la granulosa dans le but futur d'y analyser les gènes, la variation dans la quantité de cellules récupérées est grande et la contamination par le sang est fréquente (Arashiro 2011). Ensuite certaines erreurs peuvent survenir lors du transport des échantillons au laboratoire ou de l'entreposage des échantillons, jusqu'à l'analyse. Finalement, la conversion de l'ARN en ADN complémentaire peut être la cause de variations observées dans les résultats. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que l'ARN, une fois extrait, est fragile ce qui mène à certaines différences dans la qualité de celui-ci (Arashiro 2011). Les variations biologiques sont les variations considérées comme génétiques, sont les variations normales présentes lorsque l'on compare deux individus (Molloy, Brzezinski et al. 2003). Ce type de variations est inhérent à l'animal lui-même. Cette variation représente la plus proéminente dans cette étude. Les cellules étant affectées par de multiples facteurs, il est normal que la quantité d'ARN varie entre celles-ci (Bustin, Benes et al. 2005). Toutes les variations pouvant affecter une même expérience constituent la variation totale et impactent beaucoup les résultats (Haas, Manro et al. 2004).

Pour notre projet, deux types d'expériences ont été réalisés; *in vitro* et *in vivo*. L'expérience *in vivo* consiste en l'expérience principale du projet lors de laquelle les vaches étaient synchronisées et le follicule dominant était aspiré. L'avantage des expériences *in vivo* est qu'elles permettent une vue plus générale des effets d'un traitement et permet d'évaluer l'effet systémique sur un organisme vivant (Hartung and Daston 2009). Les expériences *in vitro* sont, pour leur part, pratiques grâce à l'environnement contrôlé qu'elles offrent. Les expériences *in vitro* ne permettent pas une réplique exacte des conditions biologiques retrouvées dans un corps animal entre autres en raison des déficiences au niveau des voies de signalisation. Cependant, cette méthode d'expérimentation est rapide et souvent peu coûteuse

(Gallo 2002). L'expérience *in vitro* du projet consistait en une culture cellulaire primaire de cellules de la granulosa permettant de tester l'effet des acides biliaires sur la production d'estradiol des cellules de la granulosa.

Comme mentionnés précédemment, les acides biliaires sont en quantité plus importante chez la vache laitière que chez la génisse dans le plasma et le fluide folliculaire. Dans l'un de nos articles déjà publiés, il est également montré que les niveaux d'ARNm du transporteur SLC10A2 et le récepteur membranaire GPBAR1 des acides biliaires sont plus abondants dans les cellules de la granulosa du follicule dominant des vaches comparé aux génisses (Sanchez, Schuermann et al. 2014). Il est donc logique de penser que les acides biliaires systémiques ont la capacité de se rendre dans les ovaires et pourraient potentiellement affecter les fonctions ovariennes plus précisément les activités des cellules de la granulosa. Ces observations *in vivo* nous ont amenés à vérifier l'effet des acides biliaires sur la stéroïdogénèse en utilisant une culture primaire de cellules de la granulosa. La mise en culture de cellules de granulosa avec la dose minimale d'acide cholique nécessaire à la diminution significative de synthèse d'estradiol entraîne certains changements au niveau des enzymes clés de la synthèse des hormones stéroïdiennes. Les diminutions de concentration d'aromatase et de l'enzyme CYP11A1 sont compatibles avec la réduction de la concentration d'estradiol dans la culture cellulaire. La synthèse de l'estradiol étant dépendante de ces deux enzymes, sa réduction suite à la diminution de ceux-ci est logique. L'acide cholique interagissant avec les cellules de la granulosa inhiberait la synthèse d'estrogènes. En nous appuyant sur ces résultats, nous émettons la suggestion que la prévalence des acides biliaires dans le fluide folliculaire des vaches laitières serait impliquée dans le mécanisme complexe de l'infertilité.

Conclusion

En conclusion, cette étude nous a permis de confirmer la différence au niveau métabolique entre les génisses et les vaches laitières. Grâce au séquençage d'ARN permettant d'identifier les gènes dont l'expression diffère entre les groupes, il a été possible d'identifier les gènes et les voies de signalisation potentiellement impliqués dans le mécanisme complexe de l'infertilité. Cette étude laisse à penser que les changements dans le microenvironnement folliculaire se produisant lors d'un stress métabolique pourraient altérer l'expression de certains gènes essentiels pour un bon succès reproductif. Les voies de signalisation visées sont principalement le cycle cellulaire et la stéroïdogénèse. Plusieurs changements à d'autres niveaux sont probablement présents dans le follicule dominant et resteraient à être investigués. Une meilleure vision des changements moléculaires survenant lors de stress métabolique peut nous amener une compréhension améliorée du phénomène complexe qu'est l'infertilité.

Bibliographie

- Adams, G. P., R. L. Matteri, et al. (1992). "Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers." J Reprod Fertil **94**(1): 177-188.
- Agellon, L. B. (2002). Metabolism and function of bile acids. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. D. E. V. a. J. E. Vance.:433-448.
- Arashiro, E. K. N. e. a. (2011). "125 follicular fluid and granulosa cell recovery from bovine follicles of different diameters using an adapted transvaginal-guided follicular aspiration system." Reproduction Fertility and Development **24**(1):175.
- Baptissart, M., A. Vega, et al. (2013). "Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling?" Cell Mol Life Sci **70**(23): 4511-4526.
- Bauer, S., S. Grossmann, et al. (2008). "Ontologizer 2.0--a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration." Bioinformatics **24**(14): 1650-1651.
- Bauman DE, L. A. (2006). Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. In 'Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference. M. Eastridge. Fort Wayne: 1-14.
- Beam, S. W. and W. R. Butler (1999). "Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows." J Reprod Fertil Suppl **54**: 411-424.
- Bender, K., S. Walsh, et al. (2010). "Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows." Reproduction **139**(6): 1047-1055.
- Binelli, M. and B. D. Murphy (2010). "Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells." Reprod Fertil Dev **22**(1): 1-12.

- Bisinotto, R. S., E. S. Ribeiro, et al. (2014). "Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows." Animal **8 Suppl 1**: 151-159.
- Bonneville-Hebert, A., E. Bouchard, et al. (2011). "Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling of dairy cows in Quebec." Can J Vet Res **75**(2): 147-151.
- Bouchard, E. (2003). Portrait québécois de la reproduction. Symposium sur les bovins laitier. Agriréseau. St-Hyacinthe:1-12.
- Brickell, J. S. and D. C. Wathes (2011). "A descriptive study of the survival of Holstein-Friesian heifers through to third calving on English dairy farms." J Dairy Sci **94**(4): 1831-1838.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." J Mol Endocrinol **34**(3): 597-601.
- Butler, S. T., A. L. Marr, et al. (2003). "Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A." J Endocrinol **176**(2): 205-217.
- Butler, W. R. (2005). "Relationships of negative energy balance with fertility." Advances in dairy technology **17**: 35-46.
- Butler, W. R. and R. D. Smith (1989). "Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle." J Dairy Sci **72**(3): 767-783.
- Chagas, L. M., J. J. Bass, et al. (2007). "Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows." J Dairy Sci **90**(9): 4022-4032.
- Charlton, H. (2008). "Hypothalamic control of anterior pituitary function: a history." J Neuroendocrinol **20**(6): 641-646.

- Chiang, J. Y. (2009). "Bile acids: regulation of synthesis." J Lipid Res **50**(10): 1955-1966.
- Chung, K. W. and H. M. Chung (2012). Gross anatomy. Philadelphia, PA, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins:242-252.
- Clark, A. R., Y. M. Stokes, et al. (2011). "Estimation of glucose uptake by ovarian follicular cells." Ann Biomed Eng **39**(10): 2654-2667.
- Clarke, I. J. (2014). "Interface between metabolic balance and reproduction in ruminants: focus on the hypothalamus and pituitary." Horm Behav **66**(1): 15-40.
- Clement, P. B. (1987). "Histology of the ovary." Am J Surg Pathol **11**(4): 277-303.
- Collard, B. L., P. J. Boettcher, et al. (2000). "Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation." J Dairy Sci **83**(11): 2683-2690.
- Darwasha, A. O. L., G. E. and Wooliamsa, J. A. (1997). "The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle." Animal Science **65**(01): 9-16.
- Diskin, M. G., D. R. Mackey, et al. (2003). "Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle." Anim Reprod Sci **78**(3-4): 345-370.
- Drummond, A. E. (2006). "The role of steroids in follicular growth." Reprod Biol Endocrinol **4**: 16.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, et al. (2012). "Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows." J Dairy Sci **95**(4): 1845-1854.
- Dubuc, J. L., S. (2012). "L'anovulation chez la vache laitière: un trouble méconnu." Le producteur de lait québécois **32**(35).

- Duplessis, M. C., R. Lacroix, R. Santschi, D and Lefebvre, D. (2015). "Un outil pour réduire l'âge au premier vêlage." Le producteur de lait québécois(Janvier/Février): 44-46.
- Egger-Danner, C., J. B. Cole, et al. (2015). "Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits." Animal **9**(2): 191-207.
- Feroze-Merzoug, F., I. M. Berquin, et al. (2002). "Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as a preferred internal control over GAPDH and beta-actin in quantitative RNA analyses." Biotechniques **32**(4): 776-778, 780, 782.
- Figueiredo, J. R., S. C. Hulshof, et al. (1994). "Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro." Theriogenology **41**(6): 1333-1346.
- Flanagan, C. A., R. P. Millar, et al. (1997). "Advances in understanding gonadotrophin-releasing hormone receptor structure and ligand interactions." Rev Reprod **2**(2): 113-120.
- Fortune, J. E., G. M. Rivera, et al. (2004). "Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle." Anim Reprod Sci **82-83**: 109-126.
- Fortune, J. E., M. Y. Yang, et al. (2011). "In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle." Reprod Fertil Dev **23**(1): 15-22.
- Gallo, M. (2002). In vivo and in vitro testing. Encyclopedia of public health. encyclopedia.com:11-13.
- Garry, F. B., M. J. Fettman, et al. (1994). "Serum bile acid concentrations in dairy cattle with hepatic lipidosis." J Vet Intern Med **8**(6): 432-438.
- Gasser, C. L. (2014). "Considerations on puberty in replacement beef heifers " J. Anim. Sci:1336-1340.

- Ginther, O. J., M. A. Beg, et al. (2001). "Follicle selection in monovular species." Biol Reprod **65**(3): 638-647.
- Ginther, O. J., K. Kot, et al. (1997). "Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle." Theriogenology **48**(1): 75-87.
- Goodwin, B., S. A. Jones, et al. (2000). "A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis." Mol Cell **6**(3): 517-526.
- Grohn, Y. T. and P. J. Rajala-Schultz (2000). "Epidemiology of reproductive performance in dairy cows." Anim Reprod Sci **60-61**: 605-614.
- Grummer, R. R. (2007). "Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period." Theriogenology **68 Suppl 1**: S281-288.
- Guerrero-Netro, H. M., Y. Chorfi, et al. (2015). "Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on steroidogenesis and apoptosis in granulosa cells." Reproduction **149**(6): 555-561.
- Haas, J., J. Manro, et al. (2004). In Vivo Assay Guidelines. Assay Guidance Manual. G. S. Sittampalam, N. Gal-Edd, M. Arkin et al. Bethesda (MD):1-44.
- Hanzen CH., L. O., Drion P.V. (2000). "Le développement folliculaire chez la vache. Aspects morphologiques et cinétiques." Les annales de médecine vétérinaire **144**: 223-235.
- Hare, E., H. D. Norman, et al. (2006). "Survival rates and productive herd life of dairy cattle in the United States." J Dairy Sci **89**(9): 3713-3720.
- Hartung, T. and G. Daston (2009). "Are in vitro tests suitable for regulatory use?" Toxicol Sci **111**(2): 233-237.
- Hernandez, J., J. K. Shearer, et al. (2001). "Effect of lameness on the calving-to-conception interval in dairy cows." J Am Vet Med Assoc **218**(10): 1611-1614.

- Hirshfield, A. N. (1991). "Development of follicles in the mammalian ovary." Int Rev Cytol **124**: 43-101.
- Houten, S. M., M. Watanabe, et al. (2006). "Endocrine functions of bile acids." EMBO J **25**(7): 1419-1425.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.
- Inchaisri, C., R. Jorritsma, et al. (2010). "Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle." Theriogenology **74**(5): 835-846.
- Inoue, Y., A. M. Yu, et al. (2006). "Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4alpha." J Lipid Res **47**(1): 215-227.
- Javitt, N. B. (1994). "Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways." FASEB J **8**(15): 1308-1311.
- Jenkins, G., L. J. Hardie, et al. (2008). Bile acids : toxicology and bioactivity. Cambridge, SC Pub:1-11.
- Jiang, Z. and C. A. Price (2012). "Differential actions of fibroblast growth factors on intracellular pathways and target gene expression in bovine ovarian granulosa cells." Reproduction **144**(5): 625-632.
- Johnson, K. e. a. (2011). "Rates and risk factors for contagious disease and mortality in young dairy heifers." Animal Science Reviews:1-10.
- Jorritsma, H. and R. Jorritsma (2000). "[An overview of fertility statistics and milk production data of 15 dairy operations in southeast Friesland]." Tijdschr Diergeneeskde **125**(6): 180-184.
- Jorritsma, R., T. Wensing, et al. (2003). "Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows." Vet Res **34**(1): 11-26.

- Junqueira, L. C. U. a., J. Carneiro, et al. Basic histology. A Concise medical library for practitioner and student. Los Altos, Calif. Norwalk, Conn. New York, Lange Medical Publications Appleton & Lange Lange Medical Books/McGraw Hill McGraw Hill:449-477.
- Kamimura, S., T. Ohgi, et al. (1993). "Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows." J Vet Med Sci **55**(4): 643-647.
- Kanehisa, M. and S. Goto (2000). "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." Nucleic Acids Res **28**(1): 27-30.
- Kozera, B. and M. Rapacz (2013). "Reference genes in real-time PCR." J Appl Genet **54**(4): 391-406.
- Kuhn, M. T., J. L. Hutchison, et al. (2006). "Characterization of Holstein heifer fertility in the United States." J Dairy Sci **89**(12): 4907-4920.
- Laeger, T., H. Sauerwein, et al. (2013). "Concentrations of hormones and metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows during the periparturient period." J Dairy Sci **96**(5): 2883-2893.
- Lait, C. c. d. (2014). "Production de lait à la ferme." ACC-DIA:1-1.
- Lapointe, E. and D. Boerboom (2011). "WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis." Front Biosci (Schol Ed) **3**: 276-285.
- Le Cozler, Y., V. Lollivier, et al. (2008). "Rearing strategy and optimizing first-calving targets in dairy heifers: a review." Animal **2**(9): 1393-1404.
- Lefebvre, P., B. Cariou, et al. (2009). "Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation." Physiol Rev **89**(1): 147-191.
- Lentz, G. M. (2012). Comprehensive gynecology. Philadelphia, PA, Elsevier Mosby:1-105.

- Leroy, J. L., D. Rizos, et al. (2011). "Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility." Reprod Fertil Dev **24**(1): 1-12.
- Leroy, J. L., T. Vanholder, et al. (2004). "Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows." Anim Reprod Sci **80**(3-4): 201-211.
- Leroy, J. L., T. Vanholder, et al. (2004). "Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum." Theriogenology **62**(6): 1131-1143.
- Levine, H. D. (1999). "The Repeat Breeder Cow." Bovine practioner(33): 97-105.
- Lopez-Gatius, F., J. Yaniz, et al. (2003). "Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: a meta-analysis." Theriogenology **59**(3-4): 801-812.
- Lopez, H., L. D. Satter, et al. (2004). "Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows." Anim Reprod Sci **81**(3-4): 209-223.
- Lucy, M. C. (2001). "Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?" J Dairy Sci **84**(6): 1277-1293.
- Lucy, M. C. (2008). "Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction." Reprod Domest Anim **43 Suppl 2**: 31-39.
- Marieb, E. N. (2001). Human anatomy & physiology. San Francisco, Benjamin Cummings.
- Mark, T. (2004). "Applied genetic evaluations for production and functional traits in dairy cattle." J Dairy Sci **87**(8): 2641-2652.

- Matsuda, F., N. Inoue, et al. (2012). "Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells." J Reprod Dev **58**(1): 44-50.
- Matsui, H. and T. Asami (2014). "Effects and therapeutic potentials of kisspeptin analogs: regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis." Neuroendocrinology **99**(1): 49-60.
- McArt, J. A., D. V. Nydam, et al. (2013). "Elevated non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance." Vet J **198**(3): 560-570.
- McNamara, J. P. and J. K. Hillers (1986). "Adaptations in lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation." J Lipid Res **27**(2): 150-157.
- McNatty, K. P., K. Reader, et al. (2007). "Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective." Soc Reprod Fertil Suppl **64**: 55-68.
- Meyer, C. e. a. (2015). Dictionnaire des sciences animales. CIRAD. Montpellier. **1**.
- Miller, W. L. and R. J. Auchus (2011). "The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders." Endocr Rev **32**(1): 81-151.
- Molloy, M. P., E. E. Brzezinski, et al. (2003). "Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics." Proteomics **3**(10): 1912-1919.
- Navarro, I., B. Leibush, et al. (1999). "Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **122**(2): 137-153.
- Nguyen, A. and B. Bouscarel (2008). "Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis." Cell Signal **20**(12): 2180-2197.

- Orisaka, M., K. Tajima, et al. (2009). "Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development." J Ovarian Res **2**(1): 9.
- Parhar, I. S. (2002). Gonadotropin-releasing hormone : molecules and receptors. Amsterdam ; New York, Elsevier:151-165.
- Patterson, D. J., R. C. Perry, et al. (1992). "Management considerations in heifer development and puberty." J Anim Sci **70**(12): 4018-4035.
- Perry, G. A. (2012). "Physiology and Endocrinology Symposium: Harnessing basic knowledge of factors controlling puberty to improve synchronization of estrus and fertility in heifers." J Anim Sci **90**(4): 1172-1182.
- Pryce, J. E. R., M.D. Garnsworthy, P.C. and Mao I.L. (2004). "Fertility in high-producing dairy cow." Livestock production science **86**: 125-135.
- Quirk, S. M., R. G. Cowan, et al. (2006). "The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle." J Endocrinol **189**(3): 441-453.
- Quirk, S. M., R. G. Cowan, et al. (2004). "Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival." J Anim Sci **82 E-Suppl**: E40-52.
- Rawlings, N. C., A. C. Evans, et al. (2003). "Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats." Anim Reprod Sci **78**(3-4): 259-270.
- Rekawiecki, R., J. Rutkowska, et al. (2012). "Identification of optimal housekeeping genes for examination of gene expression in bovine corpus luteum." Reprod Biol **12**(4): 362-367.
- Richards, J. S. (1994). "Hormonal control of gene expression in the ovary." Endocr Rev **15**(6): 725-751.
- Robker, R. L. and J. S. Richards (1998). "Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation." Biol Reprod **59**(3): 476-482.

- Robker, R. L. and J. S. Richards (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.
- Roche, J. R., N. C. Friggens, et al. (2009). "Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare." J Dairy Sci **92**(12): 5769-5801.
- Roelofs, J., F. Lopez-Gatius, et al. (2010). "When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects." Theriogenology **74**(3): 327-344.
- Roy, R. a. D., J. (2008) "S'attaquer à l'intervalle de vêlage." Le producteur de lait québécois:1-3.
- Rukkwamsuk, T., M. J. Geelen, et al. (2000). "Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum." J Dairy Sci **83**(1): 52-59.
- Russell, D. W. (2003). "The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis." Annu Rev Biochem **72**: 137-174.
- Sakaguchi, M., Y. Sasamoto, et al. (2004). "Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows." J Dairy Sci **87**(7): 2114-2121.
- Sanchez, R., Y. Schuermann, et al. (2014). "Differential abundance of IGF1, bile acids, and the genes involved in their signaling in the dominant follicle microenvironment of lactating cows and nulliparous heifers." Theriogenology **81**(6): 771-779.
- Sangsrivong, S., D. K. Combs, et al. (2002). "High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle." J Dairy Sci **85**(11): 2831-2842.

- Santos, J. E., H. M. Rutigliano, et al. (2009). "Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows." Anim Reprod Sci **110**(3-4): 207-221.
- Sarentonglaga, B., K. Ogata, et al. (2013). "The developmental potential of oocytes is impaired in cattle with liver abnormalities." J Reprod Dev **59**(2): 168-173.
- Sartori, R., M. R. Bastos, et al. (2010). "Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle." Reprod Fertil Dev **22**(1): 151-158.
- Sartori, R., J. M. Haughian, et al. (2004). "Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows." J Dairy Sci **87**(4): 905-920.
- Sartori, R., G. J. Rosa, et al. (2002). "Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter." J Dairy Sci **85**(11): 2813-2822.
- Scaramuzzi, R. J., D. T. Baird, et al. (2011). "Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants." Reprod Fertil Dev **23**(3): 444-467.
- Schlegel, G., R. Ringseis, et al. (2012). "Changes in the expression of hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation." J Dairy Sci **95**(7): 3826-3836.
- Senger, P. L. (2005). Pathways to pregnancy and parturition. Pullman, WA, Current Conceptions:103-116.
- Shehab-El-Deen, M. A., M. S. Fadel, et al. (2010). "Circadian rhythm of metabolic changes associated with summer heat stress in high-producing dairy cattle." Trop Anim Health Prod **42**(6): 1119-1125.
- Sherr, C. J. (1994). "The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock." Trends Cell Biol **4**(1): 15-18.

- Shimizu, T., Y. Hirai, et al. (2013). "Expression of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in granulosa cells from bovine ovary." Reprod Domest Anim **48**(5): e65-69.
- Silva, H. M., C. J. Wilcox, et al. (1992). "Factors affecting days open, gestation length, and calving interval in Florida dairy cattle." J Dairy Sci **75**(1): 288-293.
- Sloth, K. H., N. C. Friggens, et al. (2003). "Potential for improving description of bovine udder health status by combined analysis of milk parameters." J Dairy Sci **86**(4): 1221-1232.
- Smith, J. L., S. R. Lear, et al. (1998). "Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat." J Lipid Res **39**(11): 2237-2249.
- Smith, L. P., M. Nierstenhoefer, et al. (2009). "The bile acid synthesis pathway is present and functional in the human ovary." PLoS One **4**(10): e7333.
- Spicer, L. J., E. Alpizar, et al. (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, L. J., I. Bossis, et al. (2008). "Effect of plasma from cyclic versus nutritionally induced anovulatory beef heifers on proliferation of granulosa cells in vitro." Domest Anim Endocrinol **34**(3): 250-253.
- Thatcher, W. W. and C. J. Wilcox (1973). "Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow." J Dairy Sci **56**(5): 608-610.
- Thomas, P. D., A. Kejariwal, et al. (2006). "Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W645-650.
- Tilly, J. L., K. I. Kowalski, et al. (1991). "Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression." Endocrinology **129**(5): 2799-2801.

- Valacta (2008). Ajouter de la valeur à la ferme. Le producteur de lait québécois. Québec, Fédération des producteurs de lait du Québec: 56-58.
- Valacta (2013). Valacta réforme 1980-2012. Agriréseau. www.agrireseau.qc.ca.
- Valour, D. (2014). Génomique et relations nutrition-reproduction chez la vache laitière:20-264.
- Vanholder, T., J. L. Leroy, et al. (2005). "Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro." Anim Reprod Sci **87**(1-2): 33-44.
- Waldbauer, J. R., S. Rodrigue, et al. (2012). "Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle." PLoS One **7**(8): e43432.
- Walsh, S. W., J. P. Mehta, et al. (2012). "Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis." Physiol Genomics **44**(9): 504-517.
- Walsh, S. W., E. J. Williams, et al. (2011). "A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows." Anim Reprod Sci **123**(3-4): 127-138.
- Washizu, T., I. Tomoda, et al. (1991). "Serum bile acid composition of the dog, cow, horse and human." J Vet Med Sci **53**(1): 81-86.
- Wathes, D. C. (2012). "Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow." Reprod Domest Anim **47 Suppl 4**: 304-312.
- Wathes, D. C., G. E. Pollott, et al. (2014). "Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle." Animal **8 Suppl 1**: 91-104.
- Webb, R. and B. K. Campbell (2007). "Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality." Soc Reprod Fertil Suppl **64**: 141-163.

- Williams, E. J., D. P. Fischer, et al. (2007). "The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow." Theriogenology **68**(4): 549-559.
- Wiltbank, M., H. Lopez, et al. (2006). "Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism." Theriogenology **65**(1): 17-29.
- Wiltbank, M. C., R. Sartori, et al. (2011). "Managing the dominant follicle in lactating dairy cows." Theriogenology **76**(9): 1568-1582.
- Wolfenson, D., G. Inbar, et al. (2004). "Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers." Theriogenology **62**(6): 1042-1055.

Annexes

Annexe 1 – Gènes impliqués dans les voies de signalisation affectées différemment entre les génisses et les vaches laitières.

Régulation à la hausse pour les génisses		
Nom de la voie et numéro GO	Gènes impliqués	Valeur p
Estrogen receptor binding (GO:0030520)	CNOT1, CTNNB1, DYX1C1, FOXL2, MED1, MMS19, PPIID, PRMT2, WIPII	0.008
Positive regulation of cellular protein metabolism (GO:0032270)	NR1H2, TGFB1	0.01
Regulation of cell cycle G1/S phase transition (GO:1902806)	BID, CASP2, CDKN1A, ID2, INO80, TJP3	0.04
Positive regulation of metabolic process (GO:0051247)	RNF20, ATP2B4, CIB1, SAMD4A, ST5, MAP3K1,	0.02
Positive regulation of lipid transport (GO:0032370)	ABCA1, ABCG1, APOE, IL1B, NRIH2, P2RX7, PRELIDI, SCP2, bikBa	0.03
Regulation of cell cycle arrest (GO:0071156)	CASP2, CCNK, CDK9, CDKN1A, CRADD, CRLF3, DAB2IP, ID2, MED25, PKD2, PML, PPP2R5C, PRKACA, RRP8, SETMAR, TGRB1	0.04
Negative regulation of androgen receptor signaling pathway (GO:0060766)	DAB2, ESR2, HDAC1, PHB, SERP1	0.05
Régulation à la hausse pour les vaches		
Regulation of hormone levels (GO : 0010817)	BCAT2, CYP11A1, CYP19A1, FSHR, HSD17B4, INHBA, LHCGR, NR5A1, PDGFRA, RBP1, SERP1, ...	0.01
Cell growth (GO : 0016049)	MMP14, SPG20, TGFB1, DCBLD2, CDK5, MTPN, SERPINE2, TCHP, RNF6,	0.01
Cholesterol import (GO : 0070508)	APOA1, LDLR, SCARB1	0.03

Hormone metabolic process (GO : 0042445)	BMP2, CRABP2, CYP11A1, CYP19A1, FSHR, HSD17B4, LHCGR, NR5A1, PDGFRA, RBP1, ...	0.03
Low-density lipoprotein receptor particle metabolism (GO: 0032799)	APOE, CNPY2, FURIN, HNRNPK, ...	0.04
Regulation of hormone metabolic process (GO: 0032350)	ARNT, BMP2, FSHR, GATA3, HIF1A, LHCGR, TCF7L2	>0.05
Receptor of metabolic process (GO : 0043112)	CDK5, CD63,	0.02
Steroid catabolic process (GO : 0008202)	SCARB1, HSD17B14	>0.05

Annexe 2 –Voies de signalisation affectées chez la génisse

Voies de signalisation comprenant des gènes exprimés à la hausse chez la génisse		
# Voie de signalisation	Identité sur le génome bovin	Nom de la voie de signalisation
P00012	BOVIN Gene=CDH1 UniProtKB=Q6R8F2	Cadherin signaling pathway
P00006	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000006526 UniProtKB=Q05KJ0 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000008545 UniProtKB=Q2KII1	Apoptosis signaling pathway
P04393	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016532 UniProtKB=Q3SYZ2	Ras Pathway
P00035	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	Interferon-gamma signaling pathway
P00021	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	FGF signaling pathway
P05918	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000005273 UniProtKB=F1ML75 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016532 UniProtKB=Q3SYZ2	p38 MAPK pathway
P00036	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5	Interleukin signaling pathway
P00059	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020097 UniProtKB=Q3T0F1 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000031252 UniProtKB=A5D7E6	p53 pathway
P00046	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5	Oxidative stress response
P05911	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5	Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin
P00003	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	Alzheimer disease-amyloid secretase pathway
P00019	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	Endothelin signaling pathway
P00031	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000012046 UniProtKB=Q0VBZ5 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway

P00005	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016532 UniProtKB=Q3SYZ2	Angiogenesis
P00047	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5	PDGF signaling pathway
P00054	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5	Toll receptor signaling pathway
P00053	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	T cell activation
P05731	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000017239 UniProtKB=F1MF15	GABA-B receptor II signaling
P06664	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000012046 UniProtKB=Q0VBZ5 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000008182 UniProtKB=A6QLQ3 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000008545 UniProtKB=Q2KII1	Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway
P00052	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000012046 UniProtKB=Q0VBZ5 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	TGF-beta signaling pathway
P06959	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000006526 UniProtKB=Q05KJ0 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000005574 UniProtKB=P17697 BOVIN Gene=CDH1 UniProtKB=Q6R8F2	CCKR signaling map
P00057	BOVIN Gene=CDH1 UniProtKB=Q6R8F2	Wnt signaling pathway
P00056	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016532 UniProtKB=Q3SYZ2	VEGF signaling pathway
P00049	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5	Parkinson disease
P00034	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	Integrin signalling pathway
P00018	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000002813 UniProtKB=A6QLU3	EGF receptor signaling pathway
P00004	BOVIN Gene=CDH1 UniProtKB=Q6R8F2	Alzheimer disease-presenilin pathway
P00032	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015817 UniProtKB=G3N0W5	Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade

P00010	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000016156 UniProtKB=E1B8P9	B cell activation
--------	---	-------------------

Annexe 3 - Voies de signalisation affectées chez la vache laitière

Voies de signalisation comprenant des gènes exprimés à la hausse chez la vache en lactation		
# Pathway	Identité sur le génome bovin	Nom de la voie de signalisation
P00020	BOVIN Ensembl=ENSBTAG0000002882 UniProtKB=E1B8N6	FAS signaling pathway
P04397	BOVIN Gene=PRKAG1 UniProtKB=P58108	p53 pathway by glucose deprivation
P00024	BOVIN Gene=ENO1 UniProtKB=Q9XSJ4	Glycolysis
P04373	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9	5HT1 type receptor mediated signaling pathway
P00042	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000018915 UniProtKB=F1MTG3	Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway
P00055	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000021884 UniProtKB=Q5EA28	Transcription regulation by bZIP transcription factor
P04396	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000004155 UniProtKB=A4FV36	Vitamin D metabolism and pathway
P00016	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000021151 UniProtKB=Q27991	Cytoskeletal regulation by Rho GTPase
P05916	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9	Opioid prodynorphin pathway
P02776	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000031500 UniProtKB=Q3SZ20	Serine glycine biosynthesis
P00059	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000011849 UniProtKB=F1MFZ7 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000018103 UniProtKB=P10103 BOVIN Gene=THBS1 UniProtKB=Q28178	p53 pathway
P00005	BOVIN Gene=VEGFA UniProtKB=P15691	Angiogenesis
P02785	BOVIN Gene=ILVBL UniProtKB=A6QQT9	Valine biosynthesis
P00053	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000015228 UniProtKB=Q29630	T cell activation
P00031	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000018137 UniProtKB=Q7SIH1 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000017060 UniProtKB=P32592 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000021151 UniProtKB=Q27991 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000019428 UniProtKB=A0JN72	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway

P00047	BOVIN Ensembl=ENSBTAG0000000948 UniProtKB=Q148J4	PDGF signaling pathway
P05915	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9	Opioid proenkephalin pathway
P00029	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000018915 UniProtKB=F1MTG3	Huntington disease
P00050	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000023026 UniProtKB=F1MG91	Plasminogen activating cascade
P00023	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000021884 UniProtKB=Q5EA28	General transcription regulation
P00022	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000039684 UniProtKB=E1BNE7 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000021884 UniProtKB=Q5EA28 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000008642 UniProtKB=Q1RMG8	General transcription by RNA polymerase I
P05917	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9	Opioid proopioidmelanocortin pathway
P02740	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000017894 UniProtKB=F1MVC0	De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis
P06959	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000013716 UniProtKB=E1B9Y6 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000023026 UniProtKB=F1MG91	CCKR signaling map
P06664	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9 BOVIN Gene=MMP14 UniProtKB=Q9GLE4 BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000001489 UniProtKB=F2Z4C1 BOVIN Gene=PRKAG1 UniProtKB=P58108	Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway
P00044	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000021151 UniProtKB=Q27991	Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway
P05913	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9	Enkephalin release
P05912	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000020645 UniProtKB=A7MBH9	Dopamine receptor mediated signaling pathway
P00041	BOVIN Ensembl=ENSBTAG00000018915 UniProtKB=F1MTG3	Metabotropic glutamate receptor group I pathway
P00056	BOVIN Gene=VEGFA UniProtKB=P15691	VEGF signaling pathway

