

Université de Montréal

**IDENTIFICATION DE GÈNES EXPRIMÉS DANS LES
CELLULES DE LA GRANULOSA DE FOLLICULES
DOMINANTS CHEZ L'ESPÈCE BOVINE**

par

TANIA MAY FAYAD

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des Études Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Biologie Moléculaire

Novembre 2006

© Tania May Fayad, 2006



QH

506

U50

2006

V.031

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

**IDENTIFICATION DE GÈNES EXPRIMÉS DANS LES
CELLULES DE LA GRANULOSA DE FOLLICULES
DOMINANTS CHEZ L'ESPÈCE BOVINE**

Présentée par : **TANIA MAY FAYAD**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Christian DESCHEPPER, président du jury, Université de Montréal

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

Dr David SILVERSIDES, co-directeur, Université de Montréal

Dr Alan GOFF, membre du jury, Université de Montréal

Dr Vilceu BORDIGNON, examinateur externe, Université McGill

Dr Christian DESCHEPPER, représentant du Doyen

Thèse acceptée le 16 novembre 2006

Résumé

Chez les espèces mono-ovulatoires, les mécanismes associés à la sélection et à la dominance folliculaires sont peu connus. L'hypothèse générale de notre étude stipule que la dominance folliculaire résulte de l'expression spatio-temporelle de gènes spécifiques dans les cellules de la granulosa (GC) et du complexe ovocyte-cumulus (COC) du follicule sélectionné. Ces gènes contribueraient à son développement jusqu'au stade préovulatoire dans un environnement endocrinien où la majorité des follicules dégénèrent. Dans le cadre du premier projet, l'objectif était d'identifier des gènes plus fortement exprimés dans le follicule dominant (DF) comparativement aux petits follicules non sélectionnés (SF). Le deuxième projet avait comme objectifs de caractériser l'ADNc d'un gène induit dans les GC/COC du DF, soit LRP8 bovin et d'en étudier le profil d'expression au cours du développement folliculaire. La technique d'hybridation soustractive suppressive a permis de générer une génothèque soustraite d'ADNc (DF-SF) à partir de GC/COC issus de DF au jour 5 du cycle oestral (J5) (diamètre > 8 mm) et de mêmes cellules issues de SF provenant d'ovaires d'abattoir (2-4 mm). Les ADNc (837) de la génothèque soustraite DF-SF ont servi à établir des macro-réseaux qui furent criblés avec des sondes radiomarquées d'ADNc non-soustraits ou soustraits. Les ADNc différenciellement exprimés ont été séquencés et comparés dans GenBank. Les ADNc non redondants (42) ont été identifiés dont CX43, CYP19A1, INHBA et SERPINE2 qui avaient déjà été rapportés comme étant plus fortement exprimés dans le DF comparativement au SF. L'expression différentielle des ADNc codant pour

LRP8/APOER2, CPD, CSPG2, 14-3-3 epsilon, NR5A2/SF2 et RGN, identifiés pour la première fois dans le DF, a été confirmée par analyse northern ou RT-PCR de différents types de follicules ovariens : SF, DF, follicules ovulatoires (OF) stimulés à l'hCG et corps jaunes (CL) à J5. L'ADNc de LRP8 bovin a été cloné et codé pour une protéine de 829 acides aminés très conservée avec les protéines orthologues. Plusieurs isoformes de LRP8 ont été caractérisées dans les GC de DF dont une contenant une insertion cytoplasmique riche en proline (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷) impliquée dans la signalisation intracellulaire. L'expression de l'isoforme A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ est prédominante dans les GC de DF comparativement aux SF, OF et CL alors que l'expression de LDLR et de VLDLR, des récepteurs de la même famille que LRP8, reste constante. L'analyse temporelle de parois folliculaires de OF démontre une diminution de l'expression de l'ARNm de LRP8 12 h post-hCG. Des analyses d'immunobuvardage et d'immunohistochimie révèlent la localisation exclusive de la protéine LRP8 dans les GC et une expression élevée dans le DF. Aussi, l'ARNm de REELIN, un ligand de LRP8, est fortement exprimé dans la thèque de DF alors que l'ARNm de MAPK8IP1, un partenaire d'interaction intracellulaire de LRP8, est exprimé dans les GC de DF. Dans l'ensemble, cette étude rapporte l'identification de nouveaux gènes induits dans les GC de DF qui pourraient participer à la croissance et à la dominance folliculaires. De plus, l'expression différentielle des ARNm de LRP8, REELIN et MAPK8IP1 au cours de la croissance terminale du follicule suggère qu'une voie de signalisation REELIN/LRP8/MAPK8IP1 pourrait participer à la dominance folliculaire chez le bovin. **Mots clés** : bovin, ovaire, follicule, granulosa, dominance, LRP8, REELIN, MAPK8IP1.

Abstract

In mono-ovulatory species, mechanisms involved in follicular selection and dominance are poorly understood. The underlying hypothesis of this study is that follicular dominance results from the expression of specific genes in granulosa cells (GC) and the cumulus-ovocyte complex (COC) in the selected follicle that are cell specific and temporally regulated. These genes would contribute to final follicular development and ovulatory capacity of the selected follicle in an endocrine environment where most follicles degenerate. In the first project, the objectives were to isolate and identify genes preferentially expressed in the dominant follicle (DF) compared to non-elected small follicles SF. The objectives of the second project were to characterize the bovine cDNA of LRP8, a gene induced in GC of DF and, to study its expression profile during follicular growth. A subtracted cDNA library (DF-SF) was established using suppression subtractive hybridization (SSH) and GC/COC from growing DF obtained at day 5 of the estrous cycle (D5) (diameter > 8 mm) and from SF isolated from slaughterhouse ovaries (2-4 mm). cDNA clones (837) of the subtracted library (DF-SF) were used to generate identical macro-arrays. These macro-arrays were screened using radiolabeled probes generated from unsubtracted or subtracted cDNAs. Differentially expressed cDNAs were characterized by sequencing and compared in GenBank databases. Non redundant cDNAs (42) were identified. Among them, those coding for CX43, CYP19A1, INHBA and SERPINE2 were already known to be preferentially expressed in DF compared to SF. For cDNAs identified for the first time in the DF, gene expression

profiles of LRP8/APOER2, CPD, CSPG2, 14-3-3 epsilon, NR5A2/SF2 and RGN/SMP30 were analyzed by northern blot and RT-PCR in GC of bovine follicles at different developmental stages: SF, DF, ovulatory follicles (OF) 24 h post-hCG and corpus luteum (CL) at D5. Results confirmed an increase in their mRNA expression in GC of DF compared to SF. Full-length bovine LRP8 cDNA was cloned and encodes a 829-amino acid protein that is highly conserved with orthologous proteins. Several LRP8 mRNA splicing variants were characterized in GC of DF, including a variant containing a proline-rich cytoplasmic insert (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷) involved in intracellular signalling. Expression of the A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ variant was predominant in GC of DF compared to other follicles (SF, OF) and CL whereas other related receptors such as LDLR and VLDLR expression did not differ. Temporal analyses of follicular walls from OF after hCG treatment revealed a decrease of LRP8 mRNA expression initiated at 12 h post-hCG. Immunoblotting and immunohistochemical analyses demonstrated exclusive localization of LRP8 proteins in GC with highest levels in DF when compared to SF. Also, REELIN mRNA, encoding an LRP8 ligand, was highly expressed in theca of DF, whereas MAPK8IP1 mRNA, encoding an LRP8 intracellular interacting partner was expressed in GC of DF. Collectively, this study reports the identification of novel genes that are up-regulated in bovine GC of DF, which may be involved in follicular growth and dominance. Also, differential expression of LRP8, REELIN and MAPK8IP1 mRNAs during final follicular growth indicates that a REELIN/LRP8/MAPK8IP1 pathway may regulate follicular dominance in cattle. **Keywords:** bovine, ovary, follicle, granulosa, dominance, LRP8, REELIN, MAPK8IP1.

Table des matières

	Pages
Page titre	i
Page d'identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	v
Tables des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Listes des figures	xii
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xviii
CHAPITRE 1	
1. Introduction	1
2. Recension de la littérature	2
2.1 Folliculogenèse	2
2.1.1 Types folliculaires	2
2.1.1.1 Follicule primordial	4
2.1.1.2 Follicule préantral	5
2.1.1.3 Follicule antral	6
2.2 Dynamique de la croissance folliculaire	7
2.2.1 Cycle oestral bovin	8
2.2.2 Vagues folliculaires	9
2.2.2.1 Recrutement	9
2.2.2.2 Sélection	11
2.2.2.3 Dominance	12
2.2.3 Atrésie folliculaire	13
2.3 Stéroïdogenèse	17

2.3.1 Précurseurs	17
2.3.2 Transport du cholestérol et enzymes stéroïdogéniques	18
2.3.3 Concept de « deux cellules, deux gonadotropines »	19
2.3.4. Stéroïdogénèse au cours de la croissance folliculaire	19
2.4 Mécanismes de contrôle de la croissance folliculaire et de la dominance	21
2.4.1 Contrôle endocrinien	21
2.4.2 Contrôle intraovarien	22
2.4.2.1 Hormones stéroïdiennes et leurs récepteurs	22
2.4.2.2 Facteurs de croissance	24
2.4.2.3 Inhibine, activine et follistatine	28
2.5 Croissance et maturation ovocytaires	30
2.6 Rôle de l'ovocyte et des jonctions perméables	32
2.7 Ovulation et formation du corps jaune	35
2.7.1 Processus ovulatoire	35
2.7.2 Corps jaune	38
3. Problématique, hypothèse, objectifs et modèle d'étude	40
3.1 Problématique et hypothèse	40
3.2 Objectifs	41
3.3 Modèle d'étude et caractéristiques des techniques employées	41
3.3.1 Modèle animal et sélection des groupes de follicules	41
3.3.2 Utilisation de la SSH pour l'étude de l'expression différentielle des gènes dans le follicule dominant bovin (chapitre 2)	43
3.3.2.1 Choix de la technique	43
3.3.2.2 Description de la technique SSH	46

CHAPITRE 2

ARTICLE # 1: Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization

Abstract	51
Introduction	52
Materials and methods	54
Results	65
Discussion	69
Acknowledgments	77
References	78

CHAPITRE 3

ARTICLE # 2: Low-density lipoprotein receptor-related 8 (LRP8) is upregulated in granulosa cells of bovine dominant follicle: molecular characterization and spatio-temporal expression studies.

Abstract	101
Introduction	102
Materials and methods	105
Results	114
Discussion	120
Acknowledgments	125
References	126

CHAPITRE 4

4. Discussion générale	149
4.1 Identification du transcriptome ovarien à l'aide d'approches génomiques à large échelle	149
4.2 Identification d'un nouveau marqueur du follicule dominant bovin: LRP8	151
4.3 Voies de signalisation cellulaire de LRP8 et hypothèses quant à leurs rôles potentiels dans le follicule ovarien	154
4.3.1 Lien entre la signalisation par RELN, l'adhésion cellulaire et le cytosquelette	155
4.3.2 Lien entre LRP8 et la voie de signalisation de « cJUN amino-terminal kinase » (JNK)	159
5. Perspectives	162

6. Conclusion générale	166
7. Références	167

Liste des tableaux

	Pages
Chapitre 2	
Table 1	Summary of the subtracted DF-SF cDNA clones that were sequenced 91
Table 2	Identity of cDNA clones found to be differentially expressed by SSH in bovine granulosa cells of DF compared to SF 93

Liste des figures

	Pages
Chapitre 1	
Figure 1. Schéma des différents types de follicules ovariens	3
Figure 2. Représentation des vagues folliculaires au cours du cycle oestral chez la vache	10
Figure 3. Schéma représentant les étapes de la technique SSH	47
Chapitre 2	
Figure 1. Evaluation of subtraction efficiency	87
Figure 2. Representative differential screening by macroarrays of the DF-SF cDNA library	89
Figure 3. Analysis of mRNA expression by virtual Northern blot	96
Figure 4. Analysis of mRNA expression by RT-PCR	98
Chapitre 3	
Figure 1. Predicted amino acid sequence of bovine LRP8 and comparison with other mammalian orthologues	133
Figure 2. Expression of LRP8 mRNA in bovine tissues	135
Figure 3. Expression of alternative mRNA splicing variants of LRP8 in granulosa cells	137
Figure 4. Analysis of LRP8, LDLR and VLDLR mRNA expression in bovine granulosa cells and CL	139
Figure 5. Regulation of LRP8 mRNA by hCG in bovine follicles during the periovulatory period	141
Figure 6. Regulation of LRP8 protein in bovine granulosa cells and CL	143
Figure 7. Immunohistochemical localization of LRP8 in bovine ovarian follicles and corpus luteum	145
Figure 8. Regulation of RELN and MAPK8IP1 mRNA in bovine follicles	147

Liste des abréviations

(Note : la définition anglophone des termes a été conservée par souci de cohérence avec la nomenclature disponible par le « Hugo gene nomenclature committee »

(www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature)

ACAT:	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase
ADAMTS1 :	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1
ADN (DNA) :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
APAF1:	Apoptotic peptidase activating factor
APOE	Apolipoprotein E
APOER2 :	Apolipoprotein E receptor 2
ARC:	Apoptosis repressor with caspase recruitment domain
ARNm(mRNA):	Acide ribonucléique messenger
BAX:	BCL2-associated X protein
BCL2:	B-cell CLL/lymphoma 2
BID:	BH3 interacting domain death agonist
BMP15 :	Bone morphogenetic protein 15
BTG3 :	B-cell translocation gene, member 3
Cdc42	Cell division cycle 42
CEBPB :	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
CEH :	Cholesterol ester hydrolase
CG :	Cellules de la granulosa
CHIP :	Chromatin immunoprecipitation
CL :	Corpus luteum (corps jaune)
COC :	Complexe ovocyte cumulus

CSPG2 :	Chondroitin sulfate proteoglycan-2
CPD :	Carboxypeptidase D
CYP11A1 :	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
CYP17A1 :	Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
CYP19A1 :	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
DDRT-PCR :	Differential display reverse transcription and polymerase chain reaction
DF :	Follicle dominant
DFFB:	DNA fragmentation factor, 40 kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase)
DAB1:	Disabled-1
EGF :	Epidermal growth factor
EGR1 :	Early growth response 1
EMSA:	Electrophoretic mobility shift assay
ERK:	Extracellular response kinase
ESR1 :	Estrogen receptor 1 (ER alpha)
ESR2 :	Estrogen receptor 2 (ER beta)
FASLG:	Fas ligand
FGF:	Fibroblast growth factor
FGF2:	Fibroblast growth factor 2 (basic)
FOXO3A:	Forkhead box O3A
FSH :	Follicle stimulating hormone
FSHR :	Follicle stimulating hormone receptor
GDF9 :	Growth differentiation factor-9
GJA1:	Gap junction protein, alpha 1, 43 kDa (connexin 43)
GJA4:	Gap junction protein, alpha 4, 37 kDa
GJB1:	Gap junction protein, beta 1, 32 kDa
GNRH1 :	Gonadotropin-releasing hormone 1
GSTA1:	Glutathione S-transferase alpha
H :	heure
HA :	Hyaluronic acid

HAS2 :	Hyaluronan synthase 2
hCG:	human chorionic gonadotropin
HDL:	High density lipoprotein
HSD3B1 :	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1
HSD3B2:	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2
HSD17B1:	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1
IAP:	Inhibitor of apoptosis proteins
IFN-t:	Interferon-tau
IGF :	Insulin-like growth factor
IGFBP:	IGF binding proteins
INHBA:	Inhibin/activin β -A subunit
J0 :	Jour 0 (jour de l'oestrus)
J5 :	Jour 5 (5 jours après l'oestrus)
JIP-1:	c-Jun N-terminal kinase interacting protein 1
JNK:	c-Jun amino-terminal kinase
JNKK1:	JNK-activated kinase 1
JNKK2:	JNK-activating kinase 2
kDa :	Kilo dalton
LDL :	Low density lipoprotein
LDLR:	LDL receptor
LH :	Luteinizing hormone
LHCGR :	Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
LRP8 :	Low-density lipoprotein related protein 8
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MAPK8IP1:	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
MAPK8IP2:	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2
MLK3:	Mixed-lineage protein kinase 3
MPF :	M-phase promoting factor
Nckβ :	Noncatalytic region of tyrosine kinase, beta

NR5A2 :	Nuclear receptor 5A2
N-WASP :	Wiskott-Aldrich syndrome protein
OF :	Ovulatory follicle
OMI :	Oocyte meiosis inhibitor
P34 (CDC2) :	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M
P38 :	P38 map kinase
P58 (IPK) :	P58 inhibitor of RNA activated protein kinase
PAPPA :	Pregnancy-associated plasma protein A
PCR :	Polymerase chain reaction
PGE2 :	Prostaglandin E2
PGF2α :	Prostaglandin F2 α
PGR :	Progesterone receptor
PRKC:	Protein kinase C
PTGS1 :	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin synthase and cyclooxygenase) G/H
PTGS2:	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin synthase and cyclooxygenase) G/H
RACE :	Rapid amplification of cDNA ends
RDA :	Representational difference analysis
RELN :	Reelin
RGN :	Regucalcin
RhoA :	Ras homolog gene family, member A
RhoGEF :	Rho guanine nucleotide exchange factor
RhoGTPases :	Ras homolog gene family, guanosine triphosphatases
RT-PCR :	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SAGE :	Serial analysis of gene expression
SCARB1:	Scavenger receptor class B, member 1
SERPINE 2 :	Serine protease inhibitor E2
SF:	Small follicle
SSH :	Suppression subtractive hybridization
STAR :	Steroidogenic acute regulatory

TGFA :	Transforming growth factor, alpha
TGFB1 :	Transforming growth factor, beta 1
TGFBR3:	Transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300 kDa)
TIC:	Theca/interstitial cells
TNF :	Tumor necrosis factor
TNFAIP6 :	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
TNFRSF1A:	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TS-BCLL:	B cell chronic lymphocytic leukemia

Remerciements

Je tiens à remercier mon Directeur de recherche le Dr Jacques G Lussier pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche. Je le remercie pour son aide, ses conseils, sa confiance.

Aussi, mes remerciements vont à mon Co-directeur le Dr David Silversides pour sa collaboration dans mes travaux de recherche et ses conseils.

Mes sincères remerciements sont adressés :

- au Dr Jean Sirois et au Dr Réjean Lefebvre pour leur collaboration;
- à mes collègues de travail et amis principalement Mame Diouf, Alexandre Boyer, Véronique Paradis, Isabelle Daneau et Manon Salvas pour leur disponibilité, patience et gentillesse;
- A Micheline Sicotte et Vivianne Jodoin pour leur disponibilité et gentillesse;
- au personnel et à mes collègues du Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRA) de l'Université de Montréal.

Merci à mes parents, mes sœurs et à Xavier pour leur soutien.

CHAPITRE 1

1. Introduction

L'ovaire des mammifères est un organe de stockage des ovocytes formés pendant la vie embryonnaire. Sa fonction est d'utiliser progressivement cette réserve jusqu'à son épuisement. L'ovaire assure plusieurs événements essentiels de la reproduction dont la croissance des follicules, la régulation du nombre de follicules ovulatoires, l'ovulation et la formation du « corpus luteum » (CL) nécessaire au maintien de la gestation.

Le follicule ovarien représente l'unité fonctionnelle de l'ovaire et est constitué d'un ovocyte entouré d'une ou de plusieurs couches de cellules somatiques (granulosa et thèque). Le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicules primordial, primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaire et préovulatoire représentant les follicules antraux (Monniaux et al., 1993 ; Lussier et al., 1987 ; Hulshof et al., 1994). Toutefois, l'atréisie constitue le devenir de la majorité (99%) des follicules présents dans l'ovaire. Chez les ruminants, on estime à environ 6 mois le temps requis pour le développement d'un follicule ovarien à partir du stade primordial jusqu'au moment de l'ovulation (Lussier et al., 1987). Au cours du cycle oestral de la vache, la phase folliculaire se caractérise par des vagues successives de croissance folliculaire au cours desquelles il y a sélection d'un seul follicule à partir d'un groupe de follicules antraux recrutés qui deviendra le follicule dominant et qui sera capable d'ovuler si la régression lutéale se produit (Fortune et al., 2001). Les mécanismes impliqués dans ces étapes critiques de la croissance folliculaire ne sont

pas encore complètement élucidés. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes associés à la folliculogenèse et notamment à la sélection et à la dominance folliculaires afin de mieux saisir les phénomènes liés à l'infertilité et de développer de nouvelles stratégies qui augmentent l'efficacité des techniques de reproduction assistée.

2. Recension de la littérature

2.1 Folliculogenèse

La folliculogenèse ovarienne se définit par la croissance continue de follicules depuis l'initiation de leur développement, à partir de la réserve limitée de follicules primordiaux formés au cours de la vie embryonnaire, jusqu'à leur rupture lors de l'ovulation ou leur disparition suite à une régression par atresie. Il s'agit d'une succession de changements subcellulaires et moléculaires au sein des différentes composantes du follicule telles que l'ovocyte, les cellules de granulosa et de la thèque. Ce phénomène débute pendant la vie fœtale et se poursuit tout au long de la vie reproductive de la vache. Toutefois, tous les follicules ne débutent pas leur croissance en même temps. De plus, les facteurs qui déterminent le moment où un follicule primordial entame sa phase de croissance qui aboutira à l'atresie ou à l'ovulation restent peu compris.

2.1.1 Types folliculaires

Il existe trois types principaux de follicules : les follicules primordiaux, les follicules préantraux (primaires et secondaires) et les follicules antraux (Figure 1).

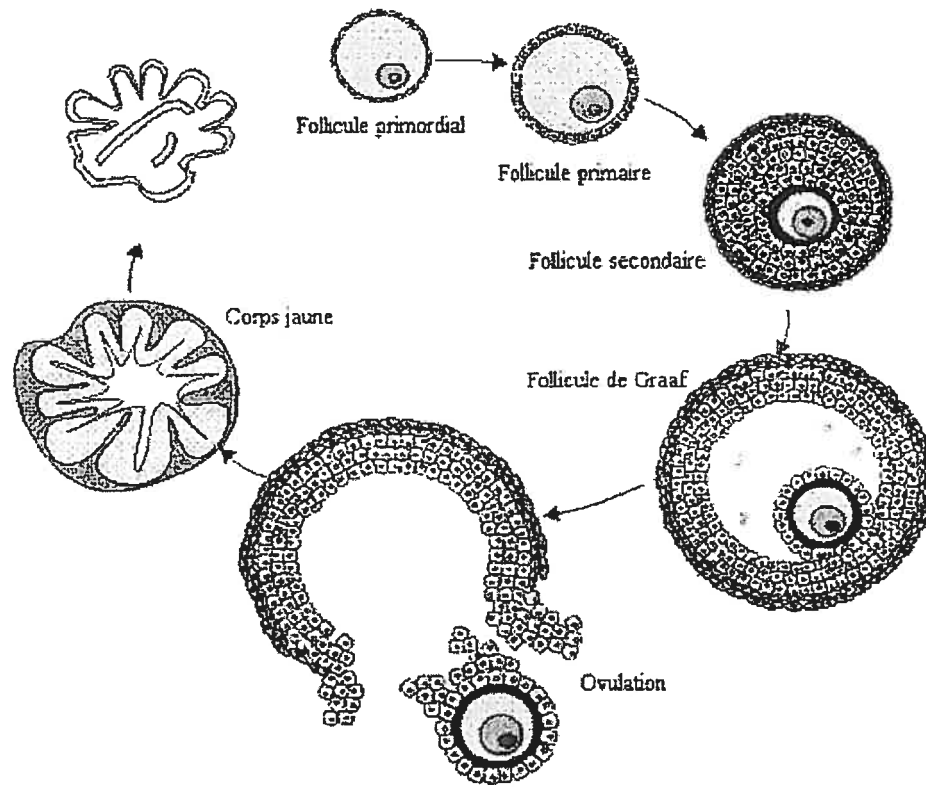


Figure 1. Schéma des différents types de follicules ovariens.

2.1.1.1 Follicule primordial

Les follicules primordiaux sont constitués d'un ovocyte arrêté au stade de la prophase I entouré d'une monocouche de cellules pré-granulosa aplaties délimitée par une lame basale et mesurent 30-50 μm de diamètre. Chez les ruminants, la formation des follicules primordiaux débute au cours du développement embryonnaire. Cette population de follicules représente la réserve d'ovocytes pour la vie reproductive de la vache et, à sa naissance, on estime entre 40 000 à 800 000 le nombre de follicules présents sur chaque ovaire (Erickson, 1966).

Le processus de formation des follicules primordiaux implique plusieurs étapes successives : l'établissement de la lignée germinale ou des cellules germinales primordiales au niveau du mésoderme extraembryonnaire de l'allantois (Eddy et al., 1981; Wylie et al., 1993; Ginsburg et al., 1990); leur migration et prolifération vers les futures gonades (Wylie, 1999); la colonisation des gonades ou crêtes génitales par ces cellules (Wylie, 1999); la formation et la prolifération des ovogonies qui initient la gamétogenèse (Gregory & Erickson, 2001); l'augmentation du nombre d'ovogonies suite à plusieurs mitoses et la différenciation des ovogonies en ovocytes qui entrent au stade prophase I de la méiose (Gregory & Erickson, 2001; Borum, 1961). Les facteurs responsables de l'entrée en méiose sont encore très peu connus. Récemment, il a été démontré que l'acide rétinolique représente un signal endogène pour l'entrée en méiose dans l'ovaire fœtal (Koubova et al., 2006).

Des études récentes très controversées suggèrent que les souris adultes possèdent des cellules souches embryonnaires capables de produire de nouveaux ovocytes et donc de former de nouveaux follicules au cours de leur vie post-natale

(Johnson et al., 2004; 2005). Une faible quantité de cellules souches pré-méiotiques seraient présentes dans l'ovaire lui-même tandis que la source principale des cellules souches nécessaires à la production de plusieurs centaines d'ovocytes à l'âge adulte proviendrait de la moelle osseuse. Ces cellules seraient transportées via la circulation sanguine périphérique jusqu'aux ovaires (Johnson et al., 2005). Cependant, la compétence développementale de ces ovocytes n'a pas encore été étudiée.

2.1.1.2 Follicule préantral

Chez l'espèce bovine, l'évolution du follicule primordial au stade de follicule primaire débute autour du 140^e jour de gestation (Rüsse, 1983). Les mécanismes responsables de cette croissance et de cette différenciation demeurent en grande partie inconnus (Fortune et al., 2000). Cependant, des études sur le facteur de transcription « forkhead box O3A » (FOXO3A) ont démontré qu'il agit comme régulateur et suppresseur de l'activation folliculaire : les souris déficientes en FOXO3a présentent une activation massive des follicules primordiaux menant à un épuisement précoce des follicules ovariens fonctionnels (Castrillon et al., 2003). D'autre part, il a été démontré qu'une diminution en progestérone et en œstrogène pourrait stimuler l'activation des follicules primordiaux (Kezele & Skinner, 2003). Le follicule primaire en croissance se caractérise par un ovocyte entouré d'une monocouche de 11 à 20 cellules cuboïdales devenues les cellules de la granulosa, par le début de la formation de la zone pellucide entourant l'ovocyte et

l'augmentation du nombre d'organites cellulaires (Rüsse, 1983; Braw-Tal, 2002). Son diamètre moyen se situe entre 60 et 80 μm .

Les premiers follicules secondaires apparaissent autour du 210^e jour de gestation (Rüsse, 1983). Ils se caractérisent par une multiplication des couches de cellules de granulosa délimitées par une membrane basale localisée à la face externe et une augmentation du diamètre de l'ovocyte entouré d'une zone pellucide bien distincte. Chez la vache, l'ensemble a un diamètre moyen de 200 μm . À la fin du stade pré-antral, les cellules de granulosa acquièrent les récepteurs à l'hormone folliculo-stimulante (FSHR) tandis que les cellules de la thèque deviennent clairement identifiables à la face externe du follicule et expriment les récepteurs à l'hormone lutéinisante (LHCGR). Malgré l'observation de sites de liaison aux gonadotropines, les premiers stades de croissance folliculaire sont indépendants des hormones gonadotropes (Roche, 1996).

2.1.1.3 Follicule antral

Le follicule tertiaire ou antral est identifié au 230^e jour de gestation (Rüsse, 1983). Il se caractérise par la formation d'une cavité à l'intérieur du follicule; l'antra folliculaire contenant le fluide folliculaire composé d'un exsudat plasmatique et de produits de sécrétion provenant des cellules folliculaires. Avec la mise en place de l'antra, il y a séparation des cellules de granulosa en cellules du cumulus et cellules formant la corona radiata qui entourent directement l'ovocyte. La communication entre les cellules de granulosa s'effectue à l'aide de multiples jonctions cellulaires

de type jonctions «gap» qui permettent l'apport de nutriments et le transfert de certains signaux régulateurs à l'ovocyte et vice versa (Larsen and Wert, 1988). Le nombre et la dimension des jonctions «gap» augmentent avec la croissance folliculaire. Parallèlement, les cellules de la thèque se différencient en thèque interne dérivée de cellules interstitielles, riches en enzymes essentielles à la stéroïdogenèse et en thèque externe caractérisée par le tassement du tissu conjonctif du stroma de l'ovaire. Ce follicule possède un diamètre moyen de 4 à 5 mm.

Le follicule mature ou De Graaf constitue le stade terminal du développement folliculaire, et représente un follicule sur 1000 qui a initié sa croissance (Saumande, 1991). Ce type de follicule se caractérise par un nombre maximal de cellules de granulosa, des thèques interne et externe bien différenciées et une cavité antrale. À ce stade, les follicules antraux sont maintenant dépendants des gonadotropines (Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996). Chez la vache, il faut environ 42 jours depuis l'apparition de l'antra dans les follicules de 0,15 mm de diamètre jusqu'à l'obtention de leur taille maximale de 15 mm au stade de follicules pré-ovulatoires (Lussier et al., 1987; Monniaux et al., 1997).

2.2 Dynamique de la croissance folliculaire

Au cours du cycle oestral de la vache, la phase folliculaire se caractérise par des vagues de croissance folliculaire au cours desquelles il y a sélection d'un seul follicule à partir d'un groupe de follicules recrutés qui deviendra le follicule dominant et qui ovulera si la régression lutéale se produit.

2.2.1 Cycle oestral bovin

Le cycle oestral de la vache se déroule sur une période de 18 à 24 jours au cours de laquelle le follicule traverse les étapes finales de son développement qui correspondent à la phase folliculaire et à la phase lutéale. L'œstrus, ou la période de chaleurs désigne le jour 0 du cycle et dure environ 12 à 16 h tandis que l'ovulation se produit environ 10 à 12 h après cette période (Rajamahendran et al., 1991). La phase lutéale débute suite à l'ovulation lorsque le follicule se transforme en CL, responsable de la sécrétion de la progestérone. Au jour 18, le CL régresse et entraîne une diminution des concentrations de progestérone marquant ainsi la fin de la phase lutéale et le début de la phase folliculaire (Figure 2). La phase folliculaire est caractérisée par des vagues de croissance folliculaire au cours desquelles les follicules antraux plus grands que 4 mm de diamètre traversent les phases de recrutement, de sélection et de dominance (Figure 2; Ginther et al., 1996, 2001). À la fin du cycle oestral, le follicule pré-ovulatoire se forme et sécrète de plus en plus d'œstrogènes. Lorsque les concentrations plasmatiques d'œstrogène sont suffisamment élevées en présence de concentrations faibles en progestérone, il y a déclenchement des chaleurs et ovulation. En absence de gestation, l'utérus produit des prostaglandines qui provoquent la régression du CL suite à laquelle la baisse des concentrations de progestérone entraîne une nouvelle relâche de FSH hypophysaire et l'initiation d'un nouveau cycle oestral. Lorsque l'animal est gestant, le CL persiste et continue sa production de progestérone. La progestérone est responsable de l'augmentation de la croissance de la muqueuse utérine, des sécrétions utérines,

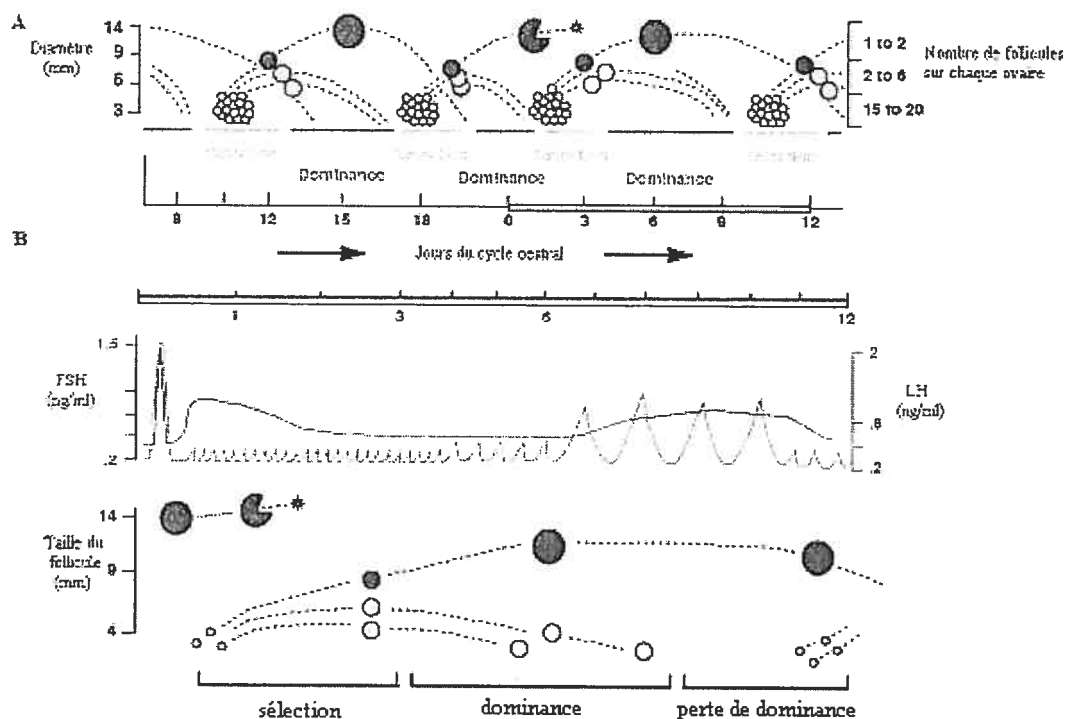
de la sécrétion du mucus par le col de l'utérus et du maintien de la gestation en empêchant le retour des chaleurs (Deziel, 1996).

2.2.2 Vagues folliculaires

Chez le bovin, on observe 2 à 3 vagues de croissance folliculaire précédant l'ovulation au cours du cycle oestral (Ginther et al., 1996; 2001; Roche 1996; Mihm et al., 2002). Ces vagues de développement folliculaire apparaissent comme des périodes de croissance et de régression synchronisées d'un groupe de 5 à 10 follicules de diamètres supérieurs à 4 mm (Figure 2; Sirois & Fortune, 1988). L'intervalle moyen qui sépare la succession des vagues est de 7 jours (Lonergan et al., 1994).

2.2.2.1 Recrutement

Au début d'un nouveau cycle oestral et suite à la relâche préovulatoire de LH stimulant l'ovulation du dernier follicule préovulatoire, une augmentation transitoire des concentrations de FSH se produit. Celle-ci provoque l'entrée en croissance terminale d'un groupe de 5 à 10 follicules sains, gonadotropines-dépendants et de diamètres supérieurs à 4 mm; il s'agit de la phase de recrutement (jours 1-3 du cycle) (Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996; Fortune et al., 2001). Si l'augmentation de la FSH est inhibée ou retardée, la vague folliculaire sera elle aussi inhibée ou retardée (Lussier et al., 1994; Fortune, 1994). D'autre part, une dose exogène de FSH provoque le recrutement d'un plus grand nombre de follicules et,



(Adapté à partir de Roche et al., 1996)

Figure 2. Représentation des vagues folliculaires au cours du cycle oestral chez la vache. A Les deux à trois vagues de croissance folliculaire au cours desquelles une cohorte de follicules entame sa croissance puis un seul follicule est sélectionné alors que les autres dégènèrent par apoptose. **B** Première vague de croissance folliculaire suite à l'ovulation.

lors de l'application des protocoles de stimulation ovarienne, la FSH exogène stimule le nombre de follicules disponibles pour l'ovulation. La garantie qu'au moins un follicule parmi la cohorte se retrouvera dans des conditions optimales de développement et de sensibilité, dans une condition endocrinienne où la concentration sanguine en FSH est faible, justifie le recrutement d'un nombre supérieur de follicules au stade de 3 à 4 mm qui assurera l'ovulation d'au moins un follicule en fin de cycle oestral (Fortune, 1994).

2.2.2.2 Sélection

La sélection fait référence au phénomène qui permet à un nombre de follicules caractéristique de l'espèce de poursuivre son développement jusqu'au stade préovulatoire. Au fur et à mesure que les concentrations de FSH sanguine baissent et que la fréquence des décharges pulsatiles de LH augmentent, le nombre de follicules en croissance diminue alors qu'un seul follicule, le plus gros, accroît sa croissance et sa synthèse d'œstradiol pour atteindre un diamètre de 8,5 mm; les follicules non sélectionnés régressent et dégèrent par atresie (Mihm, 2002). La phase de sélection est aussi caractérisée par une augmentation des concentrations de l'inhibine dans le liquide folliculaire (Knight & Glister, 2001). La sécrétion de facteurs de rétrocontrôle négatif par le follicule sélectionné tels que l'inhibine et l'œstradiol provoquerait une diminution de la sécrétion hypophysaire puis des concentrations circulantes de FSH et ainsi contribuerait au processus de sélection (Ginther et al., 2001; Fortune et al., 2001). Il a aussi été proposé que la sélection du follicule dominant puisse être un processus passif au cours duquel le premier

follicule à acquérir des LHCGR sur ses cellules de granulosa sera celui sélectionné (Xu et al., 1995; Fortune et al., 2001).

2.2.2.3 Dominance

Après sa sélection, le follicule dominant poursuit sa croissance et devient beaucoup plus gros que les autres follicules (de 8,5 mm lors de la fin de la sélection à 12-15 mm de diamètre) (Ginther et al., 1999). La dominance est à la fois morphologique parce qu'exercée par le plus gros follicule, et fonctionnelle parce que le follicule dominant possède la capacité de maintenir son développement au détriment des follicules subalternes. Des études ont montré que le follicule dominant exprime des concentrations plus élevées d'ARNm pour les récepteurs aux gonadotropines et pour les enzymes stéroïdogéniques que les follicules subordonnés (Evans & Fortune, 1997). De plus, l'activine, des facteurs de croissance et leurs protéines de liaison participent à la dominance folliculaire (Roche, 1996; Mihm, 2002). Le rôle de ces protéines sera discuté plus en détails dans les sections 2.3 et 2.4.

Normalement, la croissance et la synthèse d'œstradiol du premier follicule dominant du cycle ne se poursuivent pas plus de 3-4 jours puisque le CL en développement sécrète de la progestérone et exerce une régulation négative sur la fréquence des décharges de LH hypophysaire provoquant ainsi l'atrésie du follicule dominant devenu dépendant de la LH (Evans et al., 1997). Le déclin initial dans la sécrétion d'œstradiol au jour 6 est suivi de la perte de la dominance entre les jours 7

et 9, entraînant une nouvelle augmentation transitoire de FSH sanguine. Cette dernière stimule l'émergence d'une nouvelle croissance folliculaire à partir de 3-4 mm, suivie de la sélection d'un nouveau follicule dominant, alors que le follicule dominant de la précédente vague folliculaire régresse (Sunderland et al., 1994). Si la régression lutéale se produit au cours de la période de dominance du second follicule dominant, celui-ci ovulera. Toutefois, si le CL est toujours actif, le second follicule dominant deviendra atrésique et une troisième vague de croissance folliculaire s'effectuera et produira le troisième follicule dominant (Cooke et al., 1997).

2.2.3 Atrésie folliculaire

L'atrésie folliculaire est un événement crucial au maintien de l'homéostasie ovarienne des mammifères puisqu'elle permet d'éliminer les cellules qui sont inutiles, incorrectement développées ou endommagées mais aussi d'assurer qu'un seul ou très peu de follicules se rendent au stade préovulatoire prévenant ainsi une gestation multiple. On estime que 99,9% des follicules sont destinés à la dégénérescence (Webb et al., 2003). Le follicule atrésique se distingue du follicule sain sur les plans morphologiques et fonctionnels. Au plan fonctionnel, le follicule atrésique possède des concentrations plus élevées de progestérone et plus faibles en œstradiol causés par la perte de son activité aromatasé effectuée par l'enzyme « cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 » (CYP19A1) qui est responsable de la synthèse d'œstradiol ainsi qu'une réduction de sa synthèse d'androgènes par les cellules de la thèque (Ireland & Roche, 1982). La fréquence d'apparition de l'atrésie dans l'ovaire bovin augmente au cours des stades suivant la

formation de l'antre et est particulièrement évidente dans les cellules de granulosa de follicules de diamètres supérieurs à 2 mm (Lussier et al., 1987, 1994). Morphologiquement, l'atrésie est provoquée par le processus d'apoptose, caractérisé par l'apparition de corps picnotiques ou apoptotiques résultant de la fragmentation et de la condensation de la chromatine dans les cellules de granulosa (Hughes & Gorospe, 1991) ou encore par l'opacification de l'ovocyte (Kruip & Dieleman, 1982). Au sein des follicules antraux, c'est seulement dans les dernières étapes du processus d'apoptose que l'ovocyte est morphologiquement affecté (Driancourt et al., 1991). De plus, la nécrose semble jouer un rôle au sein des follicules en phase d'atrésie avancée (Van Wezel et al., 1999) et se caractérise par la rupture de la membrane cellulaire et la perte du cytoplasme (Kiess & Gallaher, 1998). L'apoptose joue donc un rôle primordial dans la réorganisation de la masse tissulaire au cours de chaque vague folliculaire, l'ovulation, la lutéinisation et la disparition du CL (Hsueh et al., 1994).

Plusieurs facteurs peuvent initier le processus d'apoptose tels que le manque de facteurs de croissance, des dommages à l'ADN, la liaison de récepteurs de mort cellulaire, des concentrations élevées d' adénosine monophosphate cyclique (AMPC), etc. Les protéines effectrices dans la cascade d'activation de l'apoptose sont les caspases 3, 6, et 7. Ces protéases à cystéine intracellulaires clivent leurs substrats sur des résidus aspartiques (Hengartner, 2000). Les caspases sont responsables de la destruction des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la division cellulaire, les facteurs de transcription et de traduction, des systèmes de

réparation et des protéines de structure (protéines d'adhésion, du cytosquelette, etc.). Il a été démontré que les caspases peuvent être activées directement suite à une stimulation des récepteurs de mort cellulaire par leurs ligands respectifs. C'est le cas du récepteur FAS et de son ligand « Fas ligand » (FASLG). Ceux-ci sont supprimés dans le follicule dominant comparativement aux follicules subordonnés démontrant une atrophie avancée. Cette observation suggère un rôle potentiel de FasL dans l'induction de l'apoptose au cours de l'atrophie folliculaire (Porter et al., 2001). Un autre récepteur de mort cellulaire bien connu est le « tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A » (TNFRSF1A), dont la liaison par le facteur de croissance « tumor necrosis factor » (TNF) induit l'apoptose via l'activation des caspases (Sasson et al., 2002). En contre partie, les « inhibitor of apoptosis proteins » (IAP) inhibent les caspases (Solary, 1998).

Le relargage de protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie dans le cytosol est une étape obligatoire de la voie mitochondriale de l'apoptose et est sous le contrôle des membres de la famille de « B-cell CLL/lymphoma 2 » (BCL2) (Solary et al., 2002). La protéase BCL2 est associée aux mitochondries et inhibe la libération du cytochrome C, une étape clé du processus d'apoptose. Suite à un signal apoptotique, les protéines pro-apoptotiques telles que « BCL2-associated X protein » (BAX) ou « BH3 interacting domain death agonist » (BID) sont transloquées à la mitochondrie et induisent le relargage du cytochrome C et la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Le cytochrome C s'associe à l'« apoptotic peptidase

activating factor» (APAF1) permettant le recrutement et l'activation de la caspase 9 qui active à son tour les caspases effectrices (Manabe et al., 2004).

Au cours des étapes initiales de l'apoptose dans les cellules de la granulosa, il a été observé que la production de progestérone ne diminue pas suggérant l'existence d'une voie de signalisation d'apoptose indépendante de la relâche mitochondriale de cytochrome C soit, de la destruction de la structure mitochondriale et de la perte de la stéroïdogénèse (Hosokawa et al., 1998) (voir section 2.3 pour le lien entre la mitochondrie et la stéroïdogénèse). La technique de micro-réseau utilisant des oligonucléotides a été employée pour étudier les ARNm de cellules de granulosa apoptotiques et a permis l'identification de deux nouveaux gènes impliqués dans la protection de la mitochondrie lors des premières étapes de l'apoptose : Granzyme B, une protéase capable d'activer directement la cascade des caspases et l' « apoptotic repressor with caspase recruitment domain » (ARC) qui préserve la fonction mitochondriale (Amsterdam et al., 2003; Neuss et al., 2001).

Récemment, les ARNm des cellules de granulosa et de la thèque de follicules dominants (fortement oestrogéniques) et de follicules subordonnés (faiblement oestrogéniques) bovins ont été comparés par la technique de micro-réseau utilisant un nombre limité d'ADNc fixés (Evans et al., 2004). Onze gènes reconnus comme étant impliqués dans l'apoptose ont démontré une plus forte expression dans les follicules subordonnés comparativement aux follicules dominants. Les cellules de granulosa démontrèrent une augmentation de : β glycan, « prostaglandin-

endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) » (PTGS1), TNF, « DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase)» (DFFB). Les cellules de la thèque démontrèrent une augmentation de : β glycan, caspase 13, « P58 inhibitor of RNA activated protein kinase » (P58(IPK)), APAF1, « B-cell translocation gene, member 3 » (BTG3) et « B cell chronic lymphocytic leukemia » (TS-BCLL) (Evans et al., 2004).

En contre partie, il a aussi été démontré que plusieurs facteurs de survie peuvent inhiber l'apoptose en modulant les protéines Bid et Bcl2 ou en stimulant la stéroïdogénèse tels que le « epidermal growth factor » (EGF), le « transforming growth factor alpha » (TGFA), le « fibroblast growth factor » (FGF), les gonadotropines FSH et LH, la prolactine, la leptine, les glucocorticoïdes et l'œstradiol (Amsterdam et al., 2003).

2.3 Stéroïdogénèse

2.3.1 Précurseurs

Le cholestérol représente le principal substrat pour la stéroïdogénèse ovarienne. Le cholestérol circulant sous forme de « high density lipoprotein » (HDL) constitue la source prédominante de cholestérol chez les rongeurs, tandis que les « low density lipoprotein » (LDL) sont préférentiellement utilisés chez les autres espèces, incluant la vache (Wood & Strauss, 2002). La capture du HDL implique sa liaison au récepteur « scavenger receptor class B, member 1 » (SCARB1) tandis que

celle du LDL se fait par un processus d'endocytose classique médié par le « LDL receptor » (LDLR) (Wood & Strauss, 2002). Le complexe LDL et LDLR contenu dans des vésicules mantelées est acheminé aux endosomes dans lesquels il se dissocie, puis le LDL est transporté dans les lysosomes où le cholestérol sera libéré par l'action de la « cholesterol ester hydrolase » (CEH) tandis que le récepteur est recyclé à la membrane plasmique. Le cholestérol peut être estérifié à des acides gras par l'« acetyl-Coenzyme A acetyltransferase » (ACAT) et emmagasiné dans des gouttelettes lipidiques ou transporté à la membrane mitochondriale externe (Fielding & Fielding, 2000).

2.3.2 Transport du cholestérol et enzymes stéroïdogéniques

La protéine « steroidogenic acute regulatory » (STAR) permet le transport du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne mitochondriale (Strauss et al., 1999). Ce transport semble être une étape limitante dans la synthèse des stéroïdes (Christenson et al., 2000).

La première étape enzymatique de la synthèse des stéroïdes consiste au clivage du cholestérol en prégnénolone effectué par la « cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 » (CYP11A1) (Chung et al., 1986). Dans les cellules de la thèque des follicules en croissance et dans les cellules lutéales du CL, la prégnénolone est convertie en progestérone par la « hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 » (HSD3B1) (Penning, 1997). Aussi, les cellules de la thèque synthétisent les androgènes, principalement de

l'androsténédione, à partir de la prégnénolone sous l'action enzymatique de la «cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1» (CYP17A1) (Wood et Strauss, 2002). La CYP19A1, exprimée dans les cellules de granulosa, est responsable de la conversion de l'androsténédione en estrone et de la testostérone en oestradiol (Fevold et al., 1989). La «hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1» (HSD17B1) permet la conversion de l'estrone en oestradiol et aussi celle de l'androsténédione en testostérone (Wood et Strauss, 2002). L'oestradiol représente l'œstrogène synthétisé en plus grande quantité par le follicule dominant ou préovulatoire.

2.3.3 Concept de « deux cellules, deux gonadotropines »

Le concept défini par « deux cellules, deux gonadotropines » stipule que le rôle principal de la thèque serait de produire des androgènes en réponse à la LH. Ces androgènes seront par la suite transférés dans les cellules de la granulosa et aromatisés en oestradiol en réponse à la FSH (Hillier et al., 1994). D'autre part, la progestérone peut passer de la granulosa à la thèque et servir de substrat à la synthèse des androgènes (Fortune et al., 1986).

2.3.4. Stéroïdogénèse au cours de la croissance folliculaire

De façon générale, les taux d'expression des récepteurs gonadotropes (LHCGR et FSHR), les enzymes stéroïdogéniques (CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 et HSD3B1) et de STAR augmentent dans les follicules bovins au cours de la phase de croissance antrale et diminuent au cours de l'atrésie (Bao et

Garverick, 1998). Dans les cellules de la thèque, les ARNm codant pour le LHCGR, CYP11A1, CYP17A1, HSD3B1 et STAR sont exprimés dans les follicules depuis la formation de l'antra jusqu'aux stades avancés d'atrésie où l'on observe une diminution. Contrairement aux cellules de la thèque, l'expression génique dans les cellules de la granulosa varie selon le stade de développement du follicule. Dans les follicules non recrutés (<4 mm) seule l'expression du FSHR est détectée. Suite au recrutement, les follicules (> 5 mm) expriment les enzymes CYP11A1 et CYP19A1 et autour de la période de sélection et de dominance (> 8 mm), le LHCGR et la HSD3B1 sont détectables (Bao et Garverick, 1998; Ndiaye et al., 2005).

Dans l'ensemble, ces études démontrent que dès le début d'une vague de croissance folliculaire l'expression de l'ARNm de CYP19A1 augmente dans les follicules recrutés et, suite à la sélection, le follicule dominant possède des concentrations élevées en ARNm des récepteurs aux gonadotropines et des enzymes impliquées dans la synthèse de progestérone et d'oestradiol comparativement aux follicules non sélectionnés. Le follicule à être sélectionné serait celui qui acquiert les LHCGR dans les cellules de la granulosa le plus précocement, ce qui lui permettrait de synthétiser l'oestradiol en réponse à la LH (Mihm et al., 2002). L'oestradiol agirait localement pour favoriser la stimulation de la LH et des autres facteurs de croissance produits dans le microenvironnement du follicule.

2.4 Mécanismes de contrôle de la croissance folliculaire et de la dominance

Le développement folliculaire chez les mammifères est un processus caractérisé par la prolifération et la différenciation des cellules somatiques du follicule. Le follicule en développement fournit l'environnement optimal pour la maturation de l'ovocyte qui sera prêt pour la fertilisation suite à l'ovulation. Les hormones gonadotropes représentent les régulateurs principaux du développement folliculaire antral le contrôlant via des mécanismes endocrines. D'autre part, le contrôle de la croissance folliculaire s'effectue aussi par des facteurs locaux produits par le follicule qui agissent de façon paracrine, autocrine et intracrine.

2.4.1 Contrôle endocrinien

L'hormone « luteinizing-releasing hormone ou gonadotropin-releasing hormone 1 » (GNRH1) d'origine hypothalamique est responsable de la libération de la LH et de la FSH par l'adénohypophyse (Kalra et al., 1997). Chez la vache, la phase gonado-dépendante débute lorsque les follicules atteignent 4 mm de diamètre (Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996). La FSH et la LH contrôlent le développement folliculaire et l'ovulation en agissant sur leurs cellules cibles, les cellules de la granulosa et de la thèque. Précédent la formation de l'antre, le follicule acquiert des FSHR exclusivement dans les cellules de granulosa tandis que LHCGR sont exprimés dans la thèque interne. La FSH joue un rôle essentiel lors de la phase de recrutement d'une vague folliculaire en stimulant la croissance des follicules au-delà de 2 à 4 mm de diamètre (Adams et al., 1992; Lussier et al., 1994; Gong et al., 1996). Suite à la sélection, le follicule dominant devient dépendant de la

pulsatilité de la LH dont les récepteurs sont présents dans les cellules de la thèque et de la granulosa. La LH agit sur les cellules de la thèque et induit la synthèse d'androgènes qui seront aromatisés en oestradiol par les cellules de granulosa (Sirois & Fortune, 1990). En parallèle, dans le follicule dominant, l'expression et l'activité de CYP19A1 sont stimulées par la FSH et la LH (Badinga et al., 1992). Au cours de la phase lutéale, la progestérone sécrétée par le CL provoque une diminution de la pulsatilité de la LH et par conséquent la régression du follicule dominant. Inversement, lorsque le CL régresse et que la concentration sanguine de progestérone diminue, la concentration élevée d'oestradiol synthétisée par le follicule dominant agit sur l'axe-hypothalamo-hypophysaire provoquant une relâche préovulatoire de LH suivie de l'ovulation. Ces différentes activités stéroïdogéniques, sous le contrôle des hormones gonadotropes, sont essentielles à la reproduction de la femelle.

2.4.2 Contrôle intraovarien

Les concentrations de gonadotropines à elles seules ne peuvent expliquer la complexité de la dynamique folliculaire. En effet, plusieurs facteurs locaux produits par l'ovaire jouent un rôle dans la croissance, la différenciation et la mort cellulaires.

2.4.2.1 Hormones stéroïdiennes et leurs récepteurs

Il a été démontré que les récepteurs à l'œstrogène « estrogen receptor 1 » (ESR1), « estrogen receptor 2 (ER beta) » (ESR2) et celui à la progestérone « progesterone receptor » (PGR) sont exprimés dans les follicules ovariens bovins.

Le PGR est exprimé dans les cellules de la granulosa et de la thèque mais plus faiblement que les ESRs. Son expression est significativement augmentée dans les cellules de la thèque de gros follicules (12-14 mm) (Berisha et al., 2000). Les ESR1 et ESR2 sont exprimés dans les deux compartiments cellulaires mais démontrent des taux d'expression plus élevés dans la thèque. Dans les cellules thécales, le ESR1 est plus fortement exprimé que ESR2 mais tous deux sont significativement augmentés dans les follicules préovulatoires (> 14 mm). En contre partie, les deux récepteurs sont exprimés à des taux semblables dans la granulosa et ne démontrent aucune variation au cours de la croissance du follicule (Berisha et al, 2000).

L'oestradiol exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire afin de réduire la sécrétion de FSH (Austin et al., 2001). L'oestradiol stimule la production des androgènes par les cellules de la thèque bovines (Roberts & Skinner, 1990). L'oestradiol augmente l'expression des FSHR et LHCGR et celui pour l'ocytocine dans les cellules de granulosa bovines (Uenoyama & Okuda, 1997). D'autre part, les œstrogènes contrôlent la formation des jonctions «gap» entre les cellules de la granulosa, notamment en modulant l'expression de « gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)» (GJA1) (Burghardt & Anderson, 1981). Les œstrogènes inhibent l'apoptose tandis que les androgènes la stimulent (Billig et al., 1993). À la fin de la phase folliculaire, les concentrations élevées d'oestradiol déclenchent la relâche préovulatoire de LH (Richards et al., 2002). Le rôle de la progestérone sera discuté à la section 2.7.

L'importance des actions de l'œstrogène sur l'ovaire a été mise en évidence par les phénotypes des souris déficientes en ESR (ESRKO) 1 et/ou 2 et celui des souris déficientes en CYP19A1 (ArKO) (Krege et al., 1998; Schomberg et al., 1999; Couse & Korach, 1999; Dupont et al., 2000; Britt et al., 2001). Les souris adultes ArKO et ESR1KO sont infertiles, leurs ovaires possèdent des gros follicules cystiques et il y a absence d'ovulation (Krege et al., 1998; Britt et al., 2001). Les souris ESR2KO possèdent un nombre réduit de gros follicules antraux et de CL ainsi qu'un taux élevé d'atrésie chez les gros follicules antraux. Elles sont donc moins fertiles que les souris normales et leurs ovaires démontrent une réduction de la croissance des follicules antraux et de la capacité ovulatoire (Schomberg et al., 1999).

2.4.2.2 Facteurs de croissance

Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Ils sont groupés en famille selon leur structure et activités biologiques mais leur rôle dans la folliculogénèse n'est pas entièrement élucidé. Nous discuterons des principaux systèmes de facteurs de croissance : soit « insulin-like growth factor » (IGF), FGF, EGF/TGFA et du « transforming growth factor, beta 1 » (TGFB1).

Le système IGF est composé de 2 peptides IGF1 et IGF2 (Spicer et., 1995), les récepteurs IGF de type 1 et 2 et six protéines de liaison différentes « IGF binding proteins » (IGFBP). Dans les follicules bovins, la source de IGF1 et IGFBP3 est

presqu'exclusivement systémique tandis que l'expression de IGF2 et de IGFBP4 a été détectée dans les cellules de la thèque, et celle de IGFBP2 a été localisée dans les cellules de la granulosa de follicules inférieurs à 9 mm (Armstrong et al., 2001). La localisation du récepteur IGF de type 1 reste controversée : exclusive aux cellules de granulosa (Perks et al., 1999) ou présente à la fois dans les cellules de granulosa et de la thèque (Armstrong et al., 2000). IGF1 amplifierait l'effet stimulateur des gonadotropines sur la prolifération cellulaire et la stéroïdogénèse (Spicer et al., 1993) bien que sa concentration dans le liquide folliculaire ne varie pas avec le diamètre et le stade de développement du follicule (Stewart et al., 1996). Ceci est probablement dû à sa disponibilité qui varie selon la présence des IGFBPs qui contrôlent l'activité de l'IGF en le liant avec une forte affinité empêchant ainsi l'interaction avec ses récepteurs (Chun et al., 1994). Les IGFBPs 2, 4 et 5 sont faiblement exprimées dans les follicules oestrogéniques et fortement exprimées dans les follicules atrophiques et subalternes (Echternkamp et al., 1994; Fortune et al., 2001). D'autre part, il existe des protéases dépendantes de la FSH et de IGF1 qui éliminent les IGFBPs (de la Sota et al., 1996). Une protéase spécifique à IGFBP 4, « pregnancy-associated plasma protein A » (PAPPA) a été identifiée et est exprimée dans les cellules de la granulosa des follicules sains de diamètres supérieurs à 5 mm et est considérée comme un marqueur du follicule dominant (Conover et al., 2001). La plus grande disponibilité des IGFs serait essentielle à la sélection du follicule dominant lui permettant de poursuivre sa croissance et sa synthèse d'oestradiol et en empêchant l'apoptose malgré les faibles concentrations de FSH.

Les souris déficientes en IGF1 sont infertiles et leurs ovaires possèdent des follicules arrêtés aux stades préantral ou début antral (Liu et al., 1993; Zhou et al., 1997). L'IGF1 ne serait donc pas essentiel au développement des follicules jusqu'au stade péantral. Inversement, l'absence de follicules à un stade de développement approprié pour l'ovulation suggère que IGF1 serait indispensable pour le développement folliculaire pendant et après la formation de l'antra (Baker et al., 1996; Kadakia et al., 2001).

Les FGFs représentent une famille de facteurs de croissance qui lient l'héparine et qui agissent via des récepteurs tyrosine kinase (Fornig & Gallagher, 1994). Dans l'ovaire, le membre le plus étudié est le « fibroblast growth factor 2 (basic)» (FGF2). Le FGF2 est produit dans les cellules de la granulosa et stimule la prolifération de ces cellules (Gospodarowicz & Bialecki, 1978) et celles de la thèque (Spicer & Stewart, 1996). Chez la vache, les récepteurs pour le FGF2 sont exprimés sur les cellules de la granulosa de follicules préantraux et sont moins présents dans les follicules antraux (Wandji et al., 1992). De plus, les follicules atrophiques démontrent une forte expression des récepteurs pour FGF2 (Wandji et al., 1992). Il a été démontré qu'en culture *in vitro*, le FGF2 inhibe la stimulation de la biosynthèse d'androgènes par la LH et l'IGF1 (Spicer et Stewart, 1996). Le FGF2 semble jouer plusieurs rôles au cours de la folliculogénèse soit : en stimulant la croissance des follicules préantraux, en favorisant la transformation du follicule ovulé en CL (Adashi et al., 1992) et possiblement en participant au processus d'atrophie folliculaire.

L'EGF et le TGFA appartiennent à une même famille de facteurs de croissance et se lient au récepteur de l'EGF localisé aux cellules de granulosa (Monget & Monniaux, 1995). Chez la vache, EGF et TGFA sont sécrétés par les cellules de la thèque et ont été principalement détectés dans les follicules préantraux (Skinner & Coffrey, 1988; Lobb & Dorrington, 1993). TGFA et EGF stimulent l'activité mitotique en favorisant la division cellulaire et inhibent l'activité aromatasase des cellules de la granulosa (Bendell & Dorrington, 1990). TGFA stimule la prolifération des cellules de la thèque (Skinner & Coffrey, 1988). En effet, TGFA et EGF semblent importants au cours des premiers stades de la folliculogenèse lorsque le taux de division cellulaire est élevé, tandis que la diminution de leur expression dans le follicule préovulatoire favoriserait la différenciation cellulaire. D'autre part, TGFA et EGF réduisent la production d'oestradiol en neutralisant l'effet de la FSH et augmentent la synthèse de progestérone agissant ainsi comme facteurs de lutéinisation des cellules de granulosa (Adashi et al., 1987).

La famille des facteurs de croissance TGF β 1 est constituée de plus de 30 protéines qui pour la plupart exercent leurs actions biologiques via les récepteurs membranaires sérine/thréonine kinase de type I et II (Knight & Glistler, 2003). Parmi ces protéines, le facteur TGF β est connu pour son rôle d'inhibiteur de la prolifération cellulaire en favorisant la différenciation cellulaire et l'activité aromatasase (Lobb & Dorrington, 1993) contrairement aux TGFA et EGF. Chez la vache, TGF β 1 inhibe la prolifération des cellules de granulosa et de la thèque

interne mais stimule les effets des gonadotropines sur la stéroïdogénèse (Roberts et Skinner, 1991).

2.4.2.3 Inhibine, activine et follistatine

Les inhibines et activines sont des membres de la famille des TGFB1. L'inhibine est une glycoprotéine hétérodimérique constituée des sous-unités α et β (pour former $\alpha:\beta A$ ou $\alpha:\beta B$) (Robertson et al., 1985), produite par les cellules de granulosa et qui peut exister sous plusieurs formes dimériques ou monomériques (sous-unité α libre) de différents poids moléculaires (Ethier & Findlay, 2001). Toutes les formes dimériques de l'inhibine suppriment la synthèse de FSH et sa relâche de l'adénohypophyse (Good et al., 1995). De plus, l'inhibine stimule la production d'androgènes et inhibe l'activité aromatasé chez le rat (Ying et al., 1986). Cependant, l'action de l'inhibine sur la CYP19A1 n'a pas été démontrée chez le bovin (Shukovski & Findlay, 1990). L'activine est un homodimère formé de 2 sous-unités β de l'inhibine (pour former $\beta A:\beta A$, $\beta B:\beta B$ ou $\beta A:\beta B$) qui antagonise les effets de l'inhibine en le compétitionnant sur un récepteur commun soit, le récepteur à l'activine de type II (Gray et al., 2001). L'activine stimule l'acquisition des FSHR et la synthèse de l'inhibine par les cellules de granulosa et promouvoit la prolifération cellulaire et la stéroïdogénèse au cours des étapes initiales du développement folliculaire (Xiao et al., 1992). Il a été démontré que l'inhibine est capable de lier le récepteur « transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa) » (TGFBR3) via sa sous-unité α ce qui amplifierait son

interaction au récepteur à l'activine de type II permettant ainsi une action antagoniste à l'activine plus efficace (Chapman & Woodruff, 2001). En contre partie, il est probable que la sous-unité α de l'inhibine « libre » agisse en tant qu'antagoniste de l'inhibine et agoniste de l'activine en rentrant en compétition pour la liaison du récepteur TGFBR3. D'autre part, l'interaction de l'activine avec ses récepteurs est contrôlée par les concentrations de follistatine, une protéine sécrétée par les cellules de la granulosa liant l'activine et qui neutralise ses actions à l'hypophyse et dans l'ovaire (Robertson et al., 1987).

Dans les follicules fortement oestrogéniques, la majorité des dimères d'inhibine présents sont de haut poids moléculaire tandis que les follicules faiblement oestrogéniques et démontrant des signes d'atrésie possèdent des concentrations plus élevées de dimères de faibles poids moléculaires (Ireland et al., 1994). D'autre part, les concentrations de la sous-unité α de l'inhibine sont plus élevées au cours de la phase de croissance que lors de la phase de régression du follicule dominant non ovulatoire (Guilbault et al., 1993). Aussi, le plus gros follicule d'une vague folliculaire de croissance démontre des concentrations élevées d'activine et faibles de follistatine (Austin et al., 2001). Ainsi, les concentrations d'inhibine, d'activine et de follistatine varient au cours du développement folliculaire et jouent un rôle important dans le contrôle intraovarien des processus de sélection et de dominance folliculaires.

L'invalidation de l'inhibine βA ou de la follistatine chez la souris est létale au stade embryonnaire (Pangas & Matzuk, 2004). Les souris femelles déficientes en inhibine βB sont viables et fertiles mais présentent des anomalies reproductives telles que de larges portées et une parturition retardée (Schrewe et al., 1994). Ainsi, l'inhibine βB ne serait pas essentielle à la folliculogénèse. Les souris invalidées pour l'inhibine α développent des tumeurs ovariennes et testiculaires (Matzuk et al., 1995). Cependant, précédant le développement avancé de la tumeur (environ à l'âge de 4 semaines), les ovaires de ces souris possèdent quelques follicules préantraux (Matzuk, 2000). D'autre part, les souris déficientes en récepteur à l'activine de type II sont infertiles; leurs ovaires possèdent peu de follicules antraux, un taux élevé d'atrésie folliculaire et très peu de CL (Matzuk, 2000).

2.5 Croissance et maturation ovocytaires

La croissance de l'ovocyte débute en même temps que celle du follicule lorsque celui-ci quitte la réserve de follicules primordiaux. Le noyau de l'ovocyte est alors bloqué à la phase diplotène de la prophase de la première division méiotique (Eppig, 1996). En réponse à la LH, lors de sa maturation finale, l'ovocyte complètera sa première division méiotique puis s'arrêtera en métaphase II. La méiose ne sera terminée que suite à l'activation de l'ovocyte ovulé par le spermatozoïde lors de la fécondation (Eppig, 1996). Chez la vache, du stade de follicule primordial à celui de follicule primaire, le diamètre de l'ovocyte passe de 30 à 40 μm pour atteindre 60 μm dans le follicule secondaire (Hulshof et al., 1994).

La mise en place des jonctions «gap» dès le début du développement de l'ovocyte permet la communication et le transfert de matériel entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa et ainsi la croissance de l'ovocyte (Eppig, 1996). Le follicule antral (< 1 mm) possède un ovocyte de 100 µm diamètre alors que celui > 3 mm possède un ovocyte de 120 µm de diamètre (Fair et al., 1995).

Le follicule antral mature renferme un ovocyte dont le noyau est arrêté en phase de prophase I et est entouré d'une membrane intacte formant la vésicule germinative (Eppig, 1996). La maturation finale de l'ovocyte du follicule antral se fait au niveau nucléaire, cytoplasmique et membranaire suite au pic préovulatoire de LH. Cependant, le mécanisme précis permettant l'induction de la reprise de la méiose est encore inconnu. Dans le cytoplasme, on observe une diminution de la taille de l'appareil de Golgi, un mouvement périphérique des granules corticaux et une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques (Fair et al., 1997). Dans le noyau, la reprise de la méiose se caractérise par la rupture de l'enveloppe nucléaire de la vésicule germinative. Le facteur identifié chez plusieurs espèces comme étant responsable de la reprise de la méiose est «M-phase promoting factor» (MPF) composé d'une sous-unité catalytique, la kinase «cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M» (p34(CDC2)) et d'une sous-unité régulatrice, la cycline B (Dekel, 1996). Chez le bovin, le MPF actif contrôle la maturation des ovocytes (Wu et al., 1997). Une autre hypothèse suggère que les cellules de granulosa produisent des inhibiteurs de maturation ovocytaire, des «oocyte meiosis inhibitor» (OMI) (Szöllösi, 1991) tels que l'AMPc (Downs, 1993). Suite à la relâche préovulatoire de LH, l'expansion

des cellules de cumulus qui entourent l'ovocyte interrompraient leur communication avec l'ovocyte ce qui lèverait le signal d'inhibition. Cependant, ces mécanismes diffèrent entre les espèces et les études chez la vache vont à l'encontre de cette hypothèse (Downs, 1993). En ce qui concerne la maturation membranaire, les cellules de la granulosa induisent l'acquisition de trois glycoprotéines par la zone pellucide ZP1, ZP2 et ZP3 (Dean, 1992). Lors de la fécondation, ces glycoprotéines permettent l'attachement du spermatozoïde à la zone pellucide, participent à la réaction acrosomale et bloquent la polyspermie (Hinsch & Hinsch, 1999). L'acquisition de cette spécificité chimique de la zone pellucide confère à l'ovocyte sa compétence membranaire pour la fécondation.

2.6 Rôle de l'ovocyte et des jonctions perméables

L'ovocyte favorise la croissance folliculaire et la différenciation des cellules de la granulosa en sécrétant des facteurs de croissance solubles paracrines qui agissent sur les cellules de la granulosa avoisinantes qui à leur tour contrôlent le développement de l'ovocyte (Gilchrist et al., 2004). Dans les follicules antraux, les interactions ovocyte-cellules du cumulus préviennent la lutéinisation des cellules du cumulus en stimulant la croissance, en contrôlant la stéroïdogénèse et la synthèse d'inhibine et en supprimant l'expression du LHCGR. En contre-partie, les cellules de la granulosa murale, qui ne sont pas en contact direct avec l'ovocyte, probablement soumises à des concentrations diffuses de facteurs sécrétés par l'ovocyte, possèdent un phénotype différent (Eppig, 2001). Dans le follicule

ovulatoire, les facteurs sécrétés par l'ovocyte favoriseraient l'expansion du cumulus en contrôlant la stabilité de la matrice extracellulaire, facilitant ainsi l'ovulation.

L'identité de ces facteurs ovocytaires, si importants pour la fonction ovarienne reste inconnue. Cependant, quelques candidats potentiellement importants ont été identifiés et appartiennent à la famille des TGF β , en particulier le «growth differentiation factor-9» (GDF9), le «bone morphogenic protein 15» (BMP15) mais aussi le BMP6. Le GDF9 et le BMP15 sont spécifiquement exprimés dans l'ovocyte. Au-delà du stade primaire chez la souris et la brebis, l'expression de GDF9 est indispensable au développement folliculaire tandis que celle de BMP15 est essentielle chez la brebis mais pas chez la souris (Yan et al., 2001; Hanrahan et al., 2004). Des souris femelles invalidées pour GDF9 sont acycliques et infertiles en raison de l'absence de follicules préovulatoires, d'ovulation et de gestation (Erickson & Shimasaki, 2000). Le GDF9 favorise la formation et l'intégrité du complexe ovocyte-cumulus en stimulant entre autres, l'expression de la «hyaluronan synthase 2» (HAS2) et de la «prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)» (PTGS2) (Elvin et al., 2000). Bien que moins fertiles, les souris invalidées pour BMP15 démontrent un développement folliculaire essentiellement normal (Yan et al., 2001). Une synergie entre GDF9 et BMP15 semble requise pour le développement normal du follicule et de l'ovocyte cependant son importance varie entre les espèces (Eppig, 2001). En effet, les rôles de GDF9 et de BMP15 (seuls ou ensemble) sur la fonction des

cellules de la granulosa bovines en culture ont été étudiés (McNatty et al., 2005). Cette étude démontre qu'il n'y aurait pas de coopération entre BMP15 et GDF9 puisque BMP15 à lui seul a le même effet que la combinaison BMP15 et GDF9 sur l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules de la granulosa. BMP6 est exprimé dans l'ovocyte et dans les cellules de la granulosa à partir du stade de follicule secondaire. Le BMP6, tout comme l'ovocyte, supprime la production de progestérone (en réponse à la FSH) par les cellules de la granulosa murale (Otsuka et al., 2001). Toutefois, contrairement aux activités biologiques de l'ovocyte, BMP6 ne stimule pas la prolifération des cellules de granulosa murales et ne contrôle pas la production d'oestradiol par celles-ci (Otsuka et al., 2001).

La communication entre les cellules de granulosa et l'ovocyte est bidirectionnelle et se fait grâce aux jonctions perméables. Le passage des molécules régulatrices et des petits métabolites est assuré par des connexons. Les connexons sont formés de 6 protéines de connexines et servent de canaux intercellulaires (Yeager & Nicholson, 1996). Chez le bovin, GJA1 est la connexine principalement retrouvée dans l'ovaire (Nuttinck et al., 2000). Chez la vache, GJA1 n'est pas exprimée dans les follicules primordiaux mais est présente dans les cellules de la granulosa et aussi à la frontière entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa dans les follicules primaires, secondaires et antraux (Johnson et al., 1999). L'expression de GJA1 augmente dans les follicules antraux en croissance (sains) et diminue au cours de l'atrésie folliculaire (Johnson et al., 1999). Les souris mâles et femelles déficientes en GJA1 possèdent très peu de cellules germinales (Juneja et al., 1999).

D'autre part, en absence de GJA1, les cellules de la granulosa sont incapables à proliférer et la croissance de l'ovocyte est réduite (Kidder & Mhawi, 2002). Ces résultats suggèrent que la GJA1 serait la seule connexine exprimée dans les follicules primaires et qu'elle jouerait un rôle indispensable qui ne peut pas être compensé par une autre connexine. Les connexines « gap junction protein, beta 1, 32kDa » (GJB1) et « gap junction protein, alpha 4, 37kDa » (GJA4) sont aussi exprimées dans le follicule ovarien. Cependant, les souris invalidées pour GJB1 sont fertiles suggérant que GJB1 n'est pas essentielle à la folliculogénèse (Nelles et al., 1996). Les souris déficientes pour GJA4 démontrent une folliculogénèse normale jusqu'au dernier stade préantral mais les follicules matures ne se développent pas et il n'y a pas d'ovulation (Reed et al., 1997). GJA4 serait requise pour le couplage entre l'ovocyte et les cellules de granulosa et pour prévenir la lutéinisation avant l'ovulation (Simon et al., 1997).

2.7 Ovulation et formation du corps jaune

2.7.1 Processus ovulatoire

L'ovulation est un processus complexe de type inflammatoire qui est initié par la relâche de la LH et qui est contrôlé par l'expression temporelle et spatiale de gènes spécifiques. Chez la vache, l'ovulation se produit de 29 à 31 heures après la relâche préovulatoire de LH. L'ovulation aboutit à l'expulsion d'un ovocyte mature fécondable puis à la formation du CL (Driancourt et al., 1991). Le processus ovulatoire implique plusieurs mécanismes : la rupture de la paroi folliculaire associée à un remodelage tissulaire et une réaction inflammatoire; l'arrêt de la

croissance folliculaire suivie de la différenciation des cellules de granulosa et de la thèque en cellules lutéales; l'expansion des cellules du cumulus qui marque la maturation finale du complexe COC.

À la fin de sa croissance, le follicule préovulatoire sécrète des concentrations élevées d'oestradiol capables d'induire la relâche préovulatoire de LH. La LH agit sur le follicule mature et provoque une forte augmentation intracellulaire en AMPc entraînant des voies de signalisations qui mettent fin à l'expression des gènes impliqués dans la folliculogénèse. C'est le cas des gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire comme le FSHR, le ESR2 et la cycline D2, etc., et ceux qui codent pour les enzymes stéroïdogéniques (Richards et al., 2002b; Ndiaye et al., 2005). En contre partie, la LH stimule l'expression de gènes impliqués dans l'ovulation et la lutéinisation qui seront discutés brièvement ci-dessous.

Une étape essentielle au processus ovulatoire est la production d'une matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique (HA) par les cellules du complexe ovocyte-cumulus (Chen et al., 1990). Au cours de la synthèse de cette matrice, les cellules de cumulus perdent le contact entre elles et s'éloignent de l'ovocyte, il s'agit de l'expansion du cumulus (Chen et al., 1990). Des gènes induits suite à la relâche préovulatoire de LH et qui sont essentiels à l'expansion du cumulus sont : la HAS2 qui catalyse la production de HA; la PTGS2 qui synthétise à partir de l'acide arachidonique le PGH₂, qui est transformé en PGE₂ par la « PGE synthase » (Wong & Richards, 1991; Joyce et al., 2001; Filion et al., 2001); et le « tumor necrosis

factor, alpha-induced protein 6» (TNFA1P6) qui lie HA (Yoshioka et al., 2000). Des souris déficientes en PTGS2 ou pour le récepteur de type 2 de la PGE2 ou pour TNFA1P6 démontrent des problèmes de fertilité reliés à l'absence d'ovulation et d'expansion du cumulus (Davis et al., 1999; Hizaki et al., 1999; Fulop et al., 2003). Les mécanismes moléculaires selon lesquels la LH induit l'expression de HAS2, PTGS2 et TNFA1P6 pourraient être effectués directement via les LHCGR présents dans les cellules du cumulus (cette possibilité est controversée; Robert et al., 2003) ou de façon indirecte via l'activation d'autres voies de signalisation dans le follicule (Richards et al., 2002a).

Dans les cellules de la granulosa, la LH induit aussi l'expression de facteurs de transcription dont le « early growth response 1 » (EGR1), « CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta » (CEBPB) et le PGR (Richards et al., 2002b). Les cibles de EGR1 dans l'ovaire sont inconnues mais des souris invalidées pour EGR1 n'ovulent pas, ne forment pas de CL et démontrent une synthèse sévèrement compromise de la sous-unité β de la LH (Lee et al., 1996). Les souris invalidées pour CEBPB démontrent une ovulation et une lutéinisation défectueuses. De plus, leurs ovaires possèdent une vascularisation anormale et des follicules hémorragiques indiquant que l'angiogenèse reliée à l'ovulation est défectueuse (Sterneck et al., 1997). En ce qui concerne le PGR, la LH stimule son expression dans les cellules de la granulosa murales du follicule préovulatoire (Robker et al., 2000). Les souris déficientes en PGR n'ovulent pas, bien que l'expression de PTGS2 est normale, ainsi que l'expansion du cumulus et la lutéinisation. Cependant, l'ovocyte reste

emprisonné dans le tissu lutéinisé (Robker et al., 2000). Il semblerait que les cibles de PGR soient impliquées dans la rupture du follicule plutôt que dans la lutéinisation. Récemment, une cible de PGR a été identifiée soit, «A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 » (ADAMTS1) (Vazquez et al., 1999) dont l'expression est réduite dans les cellules de la granulosa des souris déficientes en PGR. ADAMTS1 est une protéase qui clive, parmi plusieurs substrats, l' α 2-macroglobuline (Kuno et al., 1999). D'autre part, ADAMTS1 ainsi que ADAMTS4 (aussi exprimée dans l'ovaire) contrôleraient la quantité et la localisation cellulaire de plusieurs protéoglycans. Le protéoglycan versican, capable de lier le hyaluran, représente le substrat préféré de ADAMTS-1 (Sandy et al., 2001). Bien que la fonction de versican dans la matrice cumulus-ovocyte n'est pas connue, la quantité de versican est réduite dans les souris déficientes en PGR (Robker et al., 2000). En modifiant les concentrations des protéoglycans, ADAMTS1 pourrait contrôler l'activité de facteurs de croissance, tels que GDF9, EGF, TGFA etc., en activant ces facteurs dont l'activité est bloquée par leur liaison aux protéoglycans (Park et al., 2000).

2.7.2 Corps jaune

Suite à la rupture du follicule et à l'expulsion de l'ovocyte, les cellules de la granulosa et de la thèque se différencient en cellules lutéales (petites et grandes, respectivement) contribuant à la formation du CL (Acosta & Miyamoto, 2004). La progestérone représente l'hormone sécrétée en plus grande quantité par le CL et elle est cruciale dans la détermination de la durée du cycle oestral ainsi que la mise en

place et le succès de la gestation (Schams & Berisha, 2002; Niswender, 2002). La LH est essentielle au maintien de la sécrétion de progestérone par les cellules lutéales car elle stimule la synthèse des enzymes stéroïdogéniques, active la cholestérol estérase et augmente le passage de cholestérol dans la matrice mitochondriale et le transfert de prégnénolone (Murphy, 2000). D'autre part, l'ocytocine est synthétisée par les grandes cellules lutéales en fin de phase lutéale et participe à la libération de « prostaglandin F2 α » (PGF2 α) par l'endomètre utérin. La PGF2 α stimule à son tour la production de l'ocytocine lutéale. Il s'agit d'une boucle de contrôle positive qui assure la lyse complète du CL. La PGF2 α est une substance lutéolytique qui contrôle la fonction lutéale (Pate, 1994). Afin d'inhiber la sécrétion de la progestérone, PGF2 α active la « protein kinase C » (PRKC) dans les petites et grandes cellules lutéales ce qui diminue la synthèse d'AMPc et donc inhibe la stéroïdogénèse. De plus, PGF2 α provoque une baisse de la synthèse de la 2 β HSD et une augmentation de sa dégradation. Ainsi, en absence de fécondation, le CL régresse par mort cellulaire pour assurer le maintien de la cyclicité ovarienne. En contre partie, en présence de gestation, le CL est qualifié de corps jaune gestatif et l'embryon exerce alors un effet anti-lutéolytique via la sécrétion de l'interferon-tau (IFN- τ) (Roberts, 1993). L'IFN- τ agit sur l'utérus pour empêcher le développement des récepteurs à l'ocytocine et la sécrétion de la PGF2 α (Spencer et al., 2004).

3. Problématique, hypothèse, objectifs et modèle d'étude

3.1 Problématique et hypothèse

Il est nécessaire de comprendre les mécanismes associés à la folliculogenèse et notamment à la sélection et à la dominance folliculaires afin de mieux saisir les phénomènes reliés à l'infertilité et de développer de nouvelles stratégies qui augmenteraient l'efficacité des techniques de reproduction assistée. En effet, des études récentes ont mis en évidence l'importance de la maturité physiologique du follicule dominant dans les protocoles d'insémination artificielle qui utilisent la GNRH pour induire l'ovulation (Perry et al., 2005). Ils ont observé qu'une ovulation induite par la GNRH de follicules ≤ 11 mm a un effet négatif sur le taux de gestation et la survie embryonnaire alors que la taille du follicule n'a pas d'effet apparent sur la fertilité lorsque l'ovulation se produit spontanément (Perry et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les follicules ayant atteint leur maturité physiologique peuvent ovuler spontanément à des tailles variables tandis que l'induction de l'ovulation par la GNRH, lors d'application de protocoles d'insémination, provoquerait une relâche préovulatoire de LH avant que le follicule dominant n'ait complété sa maturation et croissance finales ce qui affecterait négativement le succès de l'insémination et du développement embryonnaire. Ces observations chez la vache pourraient avoir des implications sur les techniques de reproduction assistée appliquées chez l'humain. Chez les espèces mono-ovulatoires, l'étude des gènes exprimés par le follicule dominant en pleine croissance, nous permettra d'identifier les gènes contribuant au déroulement de la croissance et de la dominance folliculaires.

L'hypothèse générale de notre étude stipule que la dominance folliculaire résulte de l'expression spatio-temporelle de gènes spécifiques dans les cellules de la granulosa et du COC du follicule sélectionné. Ces gènes contribueraient à son développement jusqu'au stade préovulatoire dans un environnement endocrinien où la majorité des follicules > 4 mm dégénèrent.

3.2 Objectifs

Dans le cadre du premier projet (**chapitre 2**), l'expression génique dans les cellules de granulosa et du COC issues de follicules dominants (diamètres > 9 mm) en pleine croissance récoltés par chirurgie au jour 5 d'un cycle oestral synchronisé a été comparée à celle de mêmes cellules issues de petits follicules non sélectionnés obtenus à partir d'ovaires d'abattoir (diamètres entre 2-4 mm). L'objectif fut d'isoler et d'identifier des gènes plus fortement et/ou spécifiquement exprimés dans le follicule dominant comparativement aux petits follicules non sélectionnés en utilisant la technique SSH. Les résultats générés ont permis de développer le projet subséquent (**chapitre 3**) dont les objectifs furent de caractériser l'ADNc d'un gène induit dans les cellules de granulosa et du COC du follicule dominant, soit LRP8 bovin et d'en étudier son profil d'expression au cours du développement folliculaire.

3.3 Modèle d'étude et caractéristiques des techniques employées

3.3.1 Modèle animal et sélection des groupes de follicules

La vache a été privilégiée comme modèle expérimental car il s'agit : d'une espèce mono-ovulatoire chez laquelle les événements physiologiques ovariens sont

représentatifs de ceux rencontrés chez la femme; c'est une espèce d'importance économique; son cycle oestral peut être synchronisé; son développement folliculaire est bien caractérisé par histologie et échographie transrectale; les manipulations animales sont relativement faciles et les tissus récoltés permettent plusieurs analyses moléculaires sur des populations cellulaires ciblées. Notre modèle expérimental pour l'article 1 (chapitre 2) n'a tenu compte que des cellules de la granulosa constituant la paroi folliculaire et du COC, puisqu'elles représentent les types cellulaires les plus importants constituant le follicule. Les cellules de la granulosa forment une population cellulaire homogène, mis à part l'ovocyte, jouent un rôle endocrinien et contribuent à la maturation de l'ovocyte. De plus, en nous limitant à ces deux types cellulaires nous avons évité les écueils techniques potentiels associés à l'application de la technique d'analyse de l'expression différentielle des gènes, la SSH.

L'ensemble des expériences sur les follicules dominants et préovulatoires inclue dans les deux articles ont été réalisées sur des follicules sélectionnés selon un critère morphologique et obtenus à des stades précis de leur développement. Les vaches ont reçu une injection de $\text{PGF2}\alpha$ de façon à synchroniser leurs cycles œstraux. Suite à l'ovulation, la première vague de croissance folliculaire a été suivie par échographie transrectale. Le jour des chaleurs est défini comme le jour 0 du cycle oestral. Au jour 5, les follicules dominants (DF) en pleine croissance présentant un diamètre moyen de $10,4 \pm 0,3$ mm ($n = 4$) ont été obtenus par

colpotomie. Aussi, les CL présents sur l'ovaire au jour 5 ont été disséqués du stroma ovarien et conservés. En ce qui concerne les follicules ovulatoires (OF), ils ont été obtenus suite aux mêmes traitements que ceux décrits pour les DF suivis des traitements suivants soit : une injection de PGF 2α au jour 7 puis une dose ovulatoire de hCG au jour 9. L'ovariectomie a été réalisée 23-24 h suivant l'injection d'hCG. Les follicules préovulatoires présentaient un diamètre moyen de $12,9 \pm 0,3$ mm (n = 4). Les petits follicules non sélectionnés (SF) de diamètres entre 2-4 mm ont été récoltés à partir d'ovaires d'abattoir puis rassemblés (3 pools de 20 follicules) car le nombre de cellules par follicule est limité.

3.3.2 Utilisation de la SSH pour l'étude de l'expression différentielle des gènes dans le follicule dominant bovin (chapitre 2)

3.3.2.1 Choix de la technique

Il existe un large répertoire de techniques dont le but est de produire un inventaire des transcrits différentiellement exprimés entre deux populations d'ARNm. L'identification et l'isolement des gènes différentiellement exprimés sont généralement obtenus à l'aide des techniques suivantes : l'étalement différentiel des ARNm ou le « differential display reverse transcription and polymerase chain reaction » (DDRT-PCR) (Liang et Pardee, 1992); l'analyse différentielle représentative « representational difference analysis » (RDA) (Lisitsyn et al., 1993); la soustraction dégradative enzymatique ou « enzymatic degradation subtraction » (Zeng et al., 1994); la soustraction adaptateur capture ou « linker capture subtraction »

(Yang & Sytkowski, 1996); l'analyse en série de l'expression des gènes ou « serial analysis of gene expression » (SAGE) (Velculescu et al., 1995); les techniques impliquant le retrait physique des ARNm communs (Akopian & Wood, 1995; Deleersnijder et al., 1996); les techniques d'analyse basées sur les réseaux soit d'oligonucléotides ou d'ADNc, plus couramment appelées puces à ADN (Kidgell & Winzeler, 2005); et la SSH (Diatchenko et al., 1996). Bien que toutes ces méthodes aient prouvé leur succès dans l'isolement de gènes différentiellement exprimés, elles possèdent dans leur ensemble des limites d'application.

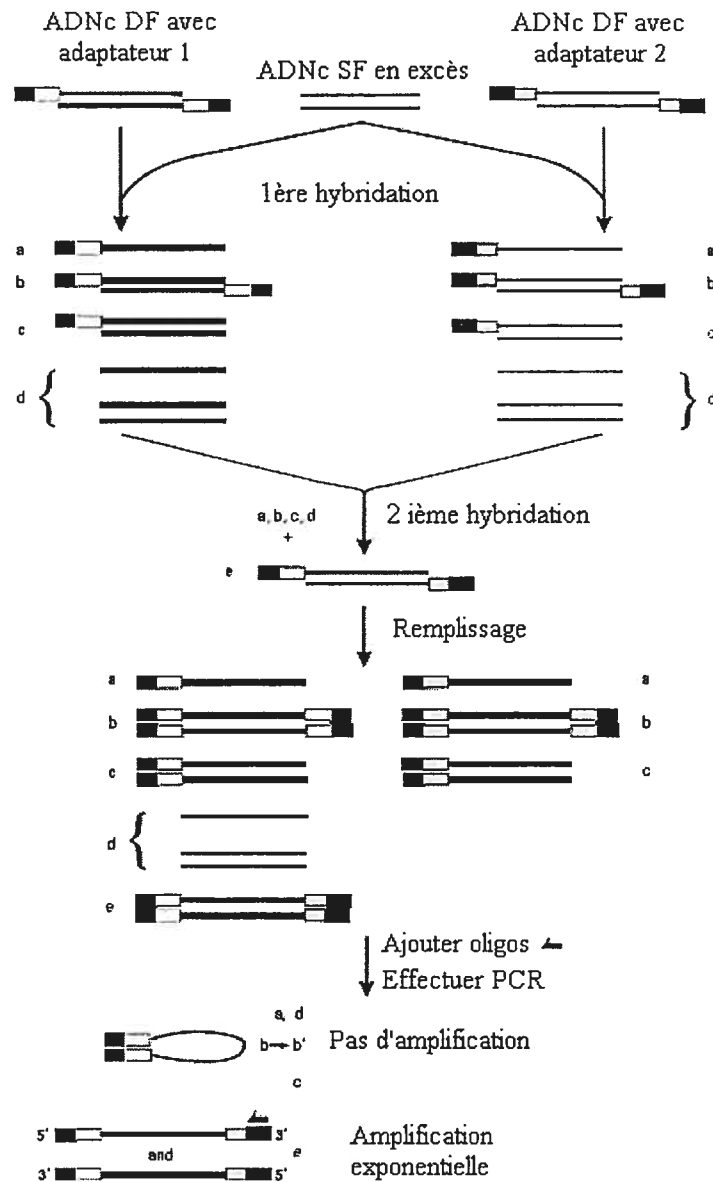
En ce qui concerne la technique de DDRT-PCR, elle introduit un biais de sélection en faveur des ARNm plus abondants, n'est pas très spécifique, produit beaucoup de faux positifs et est peu sensible lorsque les différences transcriptionnelles n'intéressent qu'un petit groupe de gènes. Aussi, l'analyse des différences est restreinte aux extrémités 3' des ADNc dont les séquences sont moins bien conservées entre les espèces, diminuant ainsi la capacité d'identifier avec certitude ces fragments lors de leur comparaison avec les séquences disponibles dans les banques de données. D'autre part, la technique de RDA nécessite une grande quantité d'ARN de départ, possède un taux élevé de faux positifs et n'est pas capable de détecter les transcrits peu abondants. La technique SAGE est limitée à l'identification d'oligonucléotides d'environ 20 nucléotides et de ce fait ne peut être appliquée avec succès que lorsque les séquences complètes du génome bovin seront disponibles dans GenBank. Bien que les puces à ADN présentent de nombreux avantages, elles possèdent quelques inconvénients dont le manque de

reproductibilité (qui dépend de la précision du « spotting » du réseau, l'efficacité de la RT-PCR, la précision dans les conditions d'hybridation et la mesure des intensités de fluorescence, etc.) et l'identification de faux positifs (Tavares & Adashi, 2002). D'autre part, plusieurs puces à ADN sont disponibles commercialement, surtout chez l'humain et la souris mais pour l'étude d'autres espèces, l'hybridation croisée s'est avérée possible mais avec une efficacité peu satisfaisante (Dalbie-Tran & Mermillod, 2003). En ce qui concerne les puces à ADN bovines, un nombre restreint de publications décrivent leur utilisation (13 entrées dans PubMed depuis 2001) ce qui démontre que leur application pour l'étude de la biologie bovine ne fait que commencer (Everts et al., 2005). En effet, la première puce à ADN bovine possédait un nombre relativement petit de cDNA qui correspondaient à environ 700 gènes (Yao et al., 2001; Burton et al.; 2001). Au moment où nous avons effectué l'étude de l'article 1 (chapitre 2), la première puce à ADN bovine à grande échelle disponible pour des études de génomique fonctionnelle a été créée par l'Université du Illinois et ne contenait que 3800 cDNA (Band et al., 2002). D'autres puces à ADN bovines ont été produites (Hashizume et al., 2002; Ishiwata et al., 2003; Herath et al., 2004) incluant celle de 18 000 cDNA produit par le « Bovine Functional Genomics Consortium » (Suchyta et al., 2003). Au fur et à mesure que le nombre de EST bovins disponibles dans GenBank augmente et que le séquençage du génome bovin progresse, l'utilisation de techniques basées sur les réseaux d'ADNc et oligonucléotides pour l'étude génomique de la biologie bovine deviendra plus efficace.

La SSH (Figure 3) est une technique d'hybridation soustractive performante qui: permet une représentation normalisée des gènes différentiellement exprimés indépendamment de leur abondance relative initiale ce qui augmente significativement la probabilité d'obtenir les ADNc exprimés en faible quantité; exclut les séquences communes entre les 2 populations; permet le suivi de l'efficacité de la soustraction avant le criblage différentiel de la librairie d'ADNc; exclut presque complètement l'isolement de clones faux positifs et permet de générer des fragments d'ADNc correspondants à diverses portions de l'ARNm (von Stein et al., 1997). À partir d'échantillons identiques, une étude récente a comparé l'analyse de l'expression génique par micro-réseau utilisant des oligonucléotides de la compagnie Affymetrix et de la SSH de la compagnie Clontech. La conclusion de leur étude stipulait que les deux approches généraient des résultats similaires mais qu'en plus la SSH permettait l'identification de nouveaux gènes et de transcrits retrouvés à de faible copies (Cao et al., 2004). Nous avons donc appliqué la SSH à l'étude de l'expression différentielle des gènes dans le follicule dominant bovin dans l'article 1 (chapitre 2).

3.3.2.2 Description de la technique SSH

Étant donné que la technique SSH présente l'inconvénient de nécessiter plusieurs μg d'ARNm poly A et que la quantité en ARNm disponible était limitée à partir des cellules isolées, les ARNm des deux populations cellulaires à comparer de petits follicles (SF) et de follicules dominants (DF) ont été rétrotranscrits en ADNc



(Adapté du cDNA Subtraction Kit User Manual Cat. No. 637401)

Figure 3. Schéma représentant les étapes de la technique SSH.

par la technique SMART-PCR. Cette technique possède l'avantage de rétrotranscrire des ARNm pleine longueur (dans la majorité des cas) à partir de seulement 1 µg d'ARN total (Zhumabayeva et al., 2001). La technique SMART-PCR a permis de générer des ADNc en quantité suffisante, sans biais de représentativité, à l'aide d'un nombre limité de cycles de PCR (15 cycles), qui ont par la suite été utilisés lors de l'application de la SSH. Pour la technique SSH proprement dite (Figure 3), les ADNc générés sont digérés par une enzyme de restriction *RsaI* afin d'obtenir des fragments d'ADNc courts dotés d'extrémités franches. Les ADNc de DF ont été divisés en deux échantillons qui ont été ligués en 5' à des adaptateurs différents. Deux hybridations successives ont été effectuées. La première était précédée d'une étape de dénaturation puis un excès d'ADNc de SF (qui ne possède pas d'adaptateurs) a été ajouté à chacun des deux échantillons d'ADNc de DF. Cette étape a un double objectif, soit : de permettre l'association sur eux-mêmes des ADNc les plus abondants, normalisant ainsi les ADNc faiblement représentés, puis de soustraire les ADNc communs entre les SF et DF. Lors de la deuxième hybridation, les deux produits issus de la première hybridation ont été mélangés, sans dénaturation préalable permettant aux ADNc de DF demeurés simple brin de s'associer et de former un nouvel hybride portant des adaptateurs différents à ses extrémités qui est ensuite amplifié par PCR au moyen d'amorces correspondantes aux deux adaptateurs. Cette réaction de PCR est suppressive car elle permet l'amplification d'ADNc portant des adaptateurs différents au détriment d'ADNc portant un seul adaptateur. Le produit issu de la soustraction (DF-SF) est donc enrichi en fragments d'ADNc correspondant aux ARNm qui sont spécifiquement ou

plus fortement exprimés dans les DF comparativement aux SF. La réaction inverse a aussi été effectuée et forme la population SF-DF. La Figure 3 montre un schéma du principe de la technique de SSH. La SSH présente plusieurs avantages : l'obtention d'un très faible bruit de fond; un enrichissement des transcrits faiblement exprimés de 1000 à 5000 fois; l'isolement de fragments d'ADNc de taille moyenne d'environ 600 pb pouvant correspondre à l'ORF; la rapidité d'exécution; et la possibilité d'identifier des ADNc connus et inconnus (Diatchenko et al., 1999).

CHAPITRE 2

ARTICLE # 1: Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization

Biology of Reproduction **70**, 523-533 (2004)

**Gene expression profiling of differentially expressed genes
in granulosa cells of bovine dominant follicles
using suppression subtractive hybridization**

Tania Fayad, Valérie Lévesque, Jean Sirois,
David W. Silversides and Jacques G. Lussier¹.


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

Published in: *Biology of Reproduction*, 2004. 70:523-533.

Running headline: Gene expression analysis in dominant follicles.

Key Words: bovine, dominant follicle, granulosa, ApoER2, CPD, CSPG2, 14-3-3
epsilon, NR5A2/SF2, RGN/SMP30.

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

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



Abstract

Development of antral follicles beyond 3 to 4 mm in cattle appears as a wave pattern that occurs two to three times during the estrous cycle. Each wave presents a cyclic recruitment of multiple follicles at the 3- to 4-mm stage, followed by the selection of a single follicle that becomes the dominant follicle (DF). The molecular determinants involved in the follicular dominance process remain poorly understood. The objective of the current study was to compare gene expression in granulosa cells (GC) between growing DF from day 5 of the estrous cycle and non-selected small follicles (SF; ≤ 4 mm) using the suppressive subtractive hybridization (SSH) approach, to identify candidate genes differentially expressed in GC of DF. The SF cDNAs were subtracted from DF cDNAs (DF-SF) and used to establish a DF GC subtracted cDNA library. A total of 42 non-redundant cDNAs were identified. Detection of previously identified genes such as, CX43, CYP19, INHBA and SERPINE2 supported the validity of our experimental model and the use of SSH as the method of analysis. For selected genes like ApoER2, CPD, CSPG2, 14-3-3 epsilon, NR5A2/SF2, RGN/SMP30 and SERPINE2, gene expression profiles were compared by virtual Northern or RT-PCR and results confirmed an increase or induction of their mRNA in GC of DF compared to SF. We conclude that we have identified novel genes (known and unknown) that are up-regulated in bovine GC that may impact follicular growth, dominance or both.

Introduction

In cattle, formation of the follicular antrum begins at a diameter of 0.2 mm, and follicles from 0.2 to 2 mm in size constitute a large pool of mostly healthy growing follicles [1,2]. As these follicles continue to develop throughout the antral phase, most of them degenerate through atresia [3]. In cattle, a critical physiological stage is reached at follicle diameter of 3 to 4 mm, when most of the follicles are lost by atresia if circulating follicle-stimulating hormone (FSH) concentrations are not adequate [2,4]. Ovarian stimulation with FSH overcomes this physiological blockade [5]. Two or three waves of 7 to 11 follicles at the 3- to 4-mm stage are recruited during the bovine estrous cycle. This cyclic recruitment process is preceded by an increase in circulating FSH concentrations [6,7]. A selection phase follows, where a single follicle continues its development and becomes the dominant follicle, whereas subordinate follicles degenerate by atresia. Circulating FSH concentrations remain low during this functional dominance phase. The mechanisms allowing a dominant follicle to be selected and potentially ovulate in conditions where other follicles degenerate are not fully understood [6,8,9]. Molecular determinants known to intervene in follicular growth and dominance involve the acquisition of gonadotropin receptors [10, 11] and steroidogenic capacity reflected by the increase in gene expression in granulosa cells (GC) for HSD3B2 and CYP19 [10, 12]. Also, growth factors belonging to the inhibin family and members of the IGF system are known to modulate the action of gonadotropins on follicles. The expression of these factors were shown to be modulated at the

mRNA and/or protein levels in relation to the development of the dominant follicle [6,8,9].

The overall objective of the present research is to identify genes that control sequential development and differentiation during the final stage of antral follicular development. The working hypothesis is that the development of dominant follicles results from the expression of genes that are cell-specific and temporally regulated. Gene expression was studied in GC since they represent an important compartment of the ovarian follicle involved in hormone synthesis and maturation of the oocyte [13]. The specific objective of this study was to identify genes that are differentially expressed in GC of growing dominant follicles compared to non-selected, ≤ 4 mm follicles, since our knowledge of the genes that regulate final follicular growth is incomplete. Gene expression analysis was performed by the use of the suppression subtractive hybridization (SSH; [14]) approach, permitting the enrichment of differentially expressed genes followed by the establishment and analysis of a subtracted cDNA library from dominant follicles. The identification and characterization of gene expression patterns occurring during final follicular growth will contribute to a better understanding of the molecular determinants impacting follicular selection and dominance.

Materials and Methods

Experimental animal model, tissue collection and RNA isolation

Holstein heifers and nonlactating primiparous cows that exhibited normal estrous cycles were maintained on hay ration. They were synchronized with one injection of PGF_{2α} (25 mg, im; Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI) given in presence of a corpus luteum (CL). Behavioral estrus was monitored at 12 h intervals, from 48 h to 96 h following PGF_{2α} injection. From the time of PGF_{2α} injection until ovariectomy, ovarian follicular development was monitored once daily by transrectal ultrasonography performed with a real-time linear scanning ultrasound diagnostic system (LS-300; Tokyo Keiki Co, Ltd, Tokyo, Japan) equipped with a 7.5-MHz transducer [2]. At each examination, the diameter of the CL and individual follicles ≥ 4 mm were measured at their largest cross-sectional area using internal calipers provided by the ultrasound unit. Following estrus synchronization by PGF_{2α}, heifers were randomly assigned to one of two treatment groups: 1) the dominant follicle group (DF), or 2) the preovulatory hCG-induced follicle group (OVU). In the DF follicle group, the ovary bearing the DF on the morning of day 5 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus) was obtained by ovariectomy (via colpotomy). The DF was defined as > 8 mm and growing while subordinate follicles were either static or regressing [5]. During the synchronized estrous cycle, the OVU follicles were obtained following an injection of 25 mg of PGF_{2α} (Lutalyse) at 22:00 h on day 7 to induce luteolysis, thereby maintaining the development of the DF of the first follicular wave into a preovulatory follicle [15]. An ovulatory dose of hCG (3000

IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC) was injected 36 h after the induction of luteolysis, and the ovary bearing the hCG-induced preovulatory follicle was collected by ovariectomy 22 to 23 h after hCG injection. Immediately following ovariectomy, ovaries were rinsed with ice-cold physiological saline and transferred into ice-cold HEPES-buffered Dulbecco modified eagle medium (DMEM; Life Technologies, Burlington, ON). Follicular fluid and GC with oocytes were collected separately from individual DF follicles or OVU follicles as described previously [16]. In the SF group, GC/oocytes and follicular fluid were collected from 2 to 4 mm follicles following their measurement at the surface of the ovary with calipers. Ovaries were obtained from Hostein cows collected at the slaughterhouse and represents a total of three pools of 20 small follicles (SF). GC collected from SF (n=20) were pooled to generate sufficient amount of total RNA to perform an SSH experiment. These experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

Concentrations of progesterone (P_4), estradiol-17 β (E_2) and their ratio (P_4/E_2) were analyzed by RIA of follicular fluid as previously described [16]. The E_2/P_4 ratios were calculated for each sample: 1) 0.008, 0.06 and 0.01 for the SF pools; 2) 17.3, 19.7, 14.3 and 63.4 for individual DF at day 5 (n = 4); and 3) 0.44, 0.87, 0.64 and 0.27 (n = 4) for individual OVU follicles. CL at day 5 of the estrous cycle were obtained by ovariectomy from cows following ultrasound monitoring of follicular development and estrus synchronization as described above. The CL were dissected from the ovarian stroma, frozen in liquid nitrogen, and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until RNA

extraction. Total RNA was isolated from GC/oocytes or CL as previously described [16]. The concentration of total RNA was quantified by measurement of optical density at 260 nm, and quality was evaluated by visualizing the 28S and 18S ribosomal bands following electrophoretic separation on a 0.66 M formaldehyde denaturing 1% agarose gel with ethidium bromide [17].

Suppression subtractive hybridization

Suppression subtractive hybridization (SSH; [14]) was used to compare gene expression in GC/oocytes collected from DF versus SF follicle groups. Identical amounts of total RNA (2 µg) from four DF or three pools of SF (n=20) follicles were pooled within treatment groups to decrease inter-animal variation. To generate sufficient amounts of double-stranded cDNA for an SSH experiment, both DF and SF cDNAs were amplified using the SMART PCR cDNA synthesis kit (User manual: PT3041-1; BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON; [18,19]). One microgram of total RNA from each pooled group was reverse-transcribed with an oligo-dT30 primer (CDS: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT₍₃₀₎(A/C/G/T)(A/G/C)-3') and PowerScript (BD Biosciences Clontech) to generate the first strand cDNA. Second cDNA strands were produced with the SMART II 5'-anchored oligo (AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG), and PCR-amplified for 15 cycles using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech).

The DF cDNAs were subtracted against SF cDNAs (forward reaction: DF-SF) using PCR-Select cDNA subtraction technology (User manual: PT1117-1; BD Biosciences Clontech). In a parallel experiment, the SF cDNAs were subtracted

against the DF cDNAs (reverse reaction: SF-DF). Briefly, PCR-generated DF and SF cDNAs were digested with *RsaI* to generate blunt-ended cDNA fragments (from 0.2 to 2 kb) that are suitable for adaptor ligation and optimal for subtractive hybridization [14]. The DF cDNAs were subdivided into two pools and ligated to different adaptors (adaptor 1: CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT; or adaptor 2R: CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT). For the first hybridization, the pools of adaptor ligated-DF (tester) and SF (driver) cDNAs were incubated for 8 hr at 68 °C. This first hybridization normalizes and enriches for differentially expressed genes. For the second hybridization, excess competitor SF cDNAs were added directly to the pooled mix of the previous two hybridizations and incubated at 68 °C for 18 hr, generating DF cDNAs harboring different 5' or 3' adaptors (1 and 2R). Differentially-expressed cDNAs with different adaptor ends in the DF group were amplified by 27 primary PCR cycles, and subsequently enriched by 12 secondary nested PCR cycles (PCR-nested 1: TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT; and PCR-nested 2R: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT).

The efficiency of subtraction was analyzed by comparing the abundance of cDNAs before and after subtraction by PCR using bovine gene specific primers for the constitutively expressed gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPD; sense: TGTTCCAGTATGATTCCACCCACG; anti-sense: CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAACC; [20]), and cytochrome P450 aromatase (P450_{arom} or CYP19), a gene known to be up-regulated in DF follicles (sense: GTCCGAAGTTGTGCCTATTGCCAGC ; anti-sense: CCTCCAGCCTGTCCAGATGCTTGG;

[21]). PCR amplification was performed using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech), and 5 μ l aliquots were removed following determined numbers of PCR cycles. The amplified products were resolved on a 2% agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, 0.5 μ g/ml ethidium bromide). The difference in the number of cycles needed to generate approximately an equal amount of the corresponding PCR product in subtracted and unsubtracted samples served to indicate the subtraction efficiency.

We have used the SSH technique since it has several important characteristics when compared with other methods, that aids in the isolation of differentially expressed genes. The PCR amplification of the cDNA pools that precedes the hybridization step allows the SSH procedure to be performed with limited quantities of mRNA [18]. It enriches for genes expressed in one sample relative to another, making it more likely that transcripts that differ greatly (> 5 fold) in representation will be isolated, rather than those with more moderate differences in expression. It overcomes the problem of differences in mRNA abundance by incorporating a hybridization step that normalizes for sequence abundance during the course of subtraction, thereby increasing the representation of rare transcripts [14]. It allows for the identification of both known and unknown genes. Since the isolated cDNA fragments often localize in open reading frame sequences, which are more conserved between species, proper gene identification via sequence data bank searches is rendered more likely. Finally, the cDNA fragments generated by SSH

can be used as probes to screen cDNA libraries to generate the corresponding full-length cDNAs and to identify novel cDNAs [22].

Cloning of subtracted cDNAs

The subtracted cDNAs were cloned into the pT-Adv plasmid (BD Biosciences Clontech) to construct the DF-SF subtracted library as described previously [22]. Ligated DNA was used to transform competent TOP10F' *E. coli*, which were plated onto S-Gal/LB agar (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) containing kanamycine (40 µg/ml). Individual colonies (n = 837) were transferred into 96-well plates, grown in LB freezing media (8.8% glycerol, 55 mM K₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 26 mM KH₂PO₄, 15 mM NH₄(SO₄)) for 14 hr at 37 °C and frozen at -70°C.

Differential hybridization screening

The subtracted DF-SF cDNA library was used to established macro-arrays for differential screening. The insert of each cDNA clone was amplified in 96-well plates by PCR (28 cycles) using the PCR-nested primers 1 and 2R, and AmpliTaq DNA polymerase (Roche Molecular Systems Inc, Laval, QC). To establish the cDNA macro-arrays, an aliquot of each amplification product was denatured in 0.3 M NaOH with 5% bromophenol blue, and 10 µl were vacuum transferred with a 96-well dot-blot apparatus onto nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) and cross-linked with UV (150 mj; Gs Gene Linker, Bio-Rad, Mississauga, ON). Control cDNAs (GAPD, P450_{arom}) were PCR-amplified from their full-length cloned cDNA plasmids using the oligos described above. The cDNA fragments were purified on a 2% agarose 1X TAE gel, and extracted (QIAquick, Gel

Extraction Kit, Qiagen Inc) before being transferred onto macro-arrays. Four identical cDNA macro-array membranes were generated from each 96-well plate.

The DF or SF unsubtracted mixtures, or the DF-SF or SF-DF subtracted mixtures were used as complex hybridization probes for differential screening of macro-arrays of the DF-SF cDNA library. Probes were obtained by performing the secondary nested-PCR, and were then purified (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen Inc). To prevent non-specific interaction of the probes to cDNAs on macro-arrays during hybridization, the adaptors were removed by three successive digestions with *AfaI*, *SmaI* and *EagI* [14], the cDNA mixture was again purified (QIAquick, PCR Purification Kit, Qiagen Inc), and 75 to 100 ng were labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP by random priming (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech). The probes were purified (QIAquick Nucleotide Removal kit, Qiagen Inc) and quantified using a beta-counter.

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

membrane. The hybridization solution was identical to the prehybridization solution but contained 15 µg salmon sperm DNA and 10% dextran sulfate. The membranes were hybridized for 16 hr at 71°C, then were washed for 15 min in 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM NaCitrate) and 0.1% SDS, followed by two one hour washes in 0.1X SSC and 0.1% SDS at 71°C. Membranes were exposed to a phosphor screen for 4 to 16 hr and the images were digitized (Storm 840; Amersham-Pharmacia Biotech). The differentially hybridizing cDNA clones were further characterized by DNA sequencing and gene expression analysis.

DNA sequencing and sequence analysis

The cDNA clones identified as differentially expressed by the DF-SF subtracted probe were amplified by PCR for 15 cycles with the corresponding PCR-nested 1 and PCR-nested 2 oligos from the PCR product generated initially for the macro-arrays. The PCR product was purified (Qiagen Inc, Mississauga, ON) and verified by agarose gel analysis for the presence of a single cDNA band before proceeding with sequencing. Ninety-seven cDNA clones were eliminated from sequencing since they presented multiple PCR fragments, 201 cDNA clones were sequenced, and 186 cDNA clones provided adequate sequencing results. Sequencing reactions were performed on cDNA clones via the dideoxy sequencing method (Big Dye Terminator 3.0; ABI Prism, Applied BioSystem, PE, Branchburg, NJ) using the oligos PCR-Nested 1 (1 mM) or P2R-INV (1 mM). Sequencing reactions were then analyzed on an ABI Prism 310 sequencer (Applied Biosystem). Nucleic acid sequences were analyzed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) against

GenBank data banks (NR and EST). A cDNA sequence was considered homologous to a GenBank sequence when at least a 100 bp matched with an E probability value of less than e^{-10} . The differentially expressed cDNAs were classified into three groups: 1) gene with known sequence and function; 2) gene with known sequence but unknown function; and 3) sequence with no significant match.

Gene expression analysis

The cDNA clones that were identified as differentially expressed in the SSH experiment were used to verify and compare their differential expression pattern in GC/oocytes of different stage follicles and corpus luteum using virtual Northern analysis or semi-quantitative RT-PCR. To perform virtual Northern blots, SMART PCR cDNA synthesis technology (BD Biosciences Clontech) was used to generate cDNAs from 1 μ g of total RNA isolated from GC/oocytes or CL as described above. The SMART cDNA synthesis was done in a total volume of 10 μ l with the addition of 42 ng of T4 gene 32 protein (Roche Molecular Biochemicals, Laval, PQ) and PCR-amplified for 15 cycles as described previously [22]. The resulting cDNA pool was diluted to 50 μ l in TE buffer, and 1 μ l of the diluted pool was used in a secondary 100 μ l PCR reaction for 18 cycles using Advantage 2 DNA polymerase and the PCR primer (AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT). The cDNA products (10 μ l) of the secondary PCR for each follicle or CL were separated on a 0.8% TBE-agarose gel (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, 0.5 μ g/ml ethidium bromide) for 4-5 hr at 80-90 volts [17]. Molecular weight standards (1 kb ladder, ϕ X174-RF/Hae III and λ /Hind III; Amersham Pharmacia Biotech) were included to estimate size. The gel

was washed in TBE buffer for 30 min, and cDNA samples were transferred onto nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham-Pharmacia Biotech) by alkaline capillary transfer [17], and then cross-linked by UV treatment (150 mJ; GS Gene Linker, BioRad laboratories).

Virtual Northern analysis was performed with differentially expressed cDNA fragments from the DF-SF group that had been classified as genes with known sequences and functions. GAPD was used as a control gene. Gene-specific probes were generated by PCR (20 cycles) using the primers PCR-Nested 1 and PCR-Nested 2R. The PCR products were separated on a 2% agarose gel in 1X TAE buffer. The cDNA bands were purified (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen Inc), digested with *AfaI* and *EagI* then re-purified (QIAquick, PCR Purification Kit, Qiagen Inc), and labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP as described above. Virtual Northern membranes were prehybridized, hybridized and washed as described for the differential hybridization of macro-arrays, except that oligos were omitted during the prehybridization and hybridization steps. Membranes were exposed to a phosphor screen and the images were digitized (Storm 840; Amersham Pharmacia Biotech).

Semi-quantitative RT-PCR was performed for genes that showed either a weak or no signal by virtual Northern analysis, or for which gene-specific primers were available. SMART cDNAs from secondary PCR reactions were diluted tenfold in TE buffer and 1 μl was used in a 25 μl PCR reaction using the Advantage 2 DNA polymerase. The number of PCR cycles were limited and optimized for each gene to

be analyzed. Gene specific PCR primers were for steroidogenic factor-2 (SF2; sense: AGAAAGCGTTGTCCCTACTGTCG; anti-sense: TCTGGCTCACACTTCAAAAGTTCC; [23]), pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A; sense: CCTGCATGGAGACAGAGCCCT; anti-sense: CAGTCAGTGGAGACAAAGGTC; [24]), and GAPD as described above. Twenty μ l of the PCR reactions were separated on a 2% TAE-agarose gel with ethidium bromide, PCR products were visualized by UV and the images digitized. The digitized signals for each gene obtained either by virtual Northern or semi-quantitative RT-PCR were analyzed by densitometry using ImageQuant software (Amersham Pharmacia Biotech).

Statistical analysis

Gene-specific signals for virtual northern blots or RT-PCR analysis were normalized with corresponding GAPD signals for each sample. Homogeneity of variance between follicular group and CL was verified by O'Brien and Brown-Forsythe tests [25]. Corrected values of gene specific mRNA levels were compared between follicular or CL groups by one-way ANOVA. When ANOVA indicated significant difference ($p < 0.05$), group means were compared by Tukey-Kramer multiple comparison tests. Data were presented as least-square means \pm SEM.

Results

Identification of differentially expressed genes using SSH

To construct a subtracted cDNA library enriched in transcripts that are preferentially expressed in DF compared to SF, mRNA from the GC/oocytes of SF was reverse-transcribed into cDNAs, and subtracted from DF cDNAs by SSH (DF-SF). As a control, the reverse hybridization was also performed and consisted of DF cDNAs that were subtracted from SF cDNAs (SF-DF). The subtraction efficiency was evaluated by PCR analysis by comparing the abundance of two control cDNAs preceding and following subtraction. Firstly, GAPD was used as a control to confirm the reduced relative abundance of a housekeeping gene in the subtracted samples following the SSH procedure. The GAPD PCR product was observed after 15 PCR cycles in the DF unsubtracted sample, whereas in the DF-SF subtracted sample, the PCR-amplified GAPD fragment required five more PCR cycles to be detected on agarose gel (Figure 1 A). This indicated a marked decrease of GAPD cDNA abundance in the DF-SF subtracted sample. Secondly, CYP19 was used as a positive control for the enrichment of a differentially expressed gene in the DF-SF subtracted sample. To this end, PCR analysis was used to compare the abundance of CYP19 in DF to the DF-SF or SF-DF subtracted samples. The analysis showed that CYP19 PCR product was mainly observed in the GC of DF compared to SF (Figure 1B), and that CYP19 cDNA was efficiently enriched in the subtracted DF-SF sample when compared to the unsubtracted DF sample. Conversely, CYP19 cDNA was completely depleted in the reverse-subtracted (SF-DF) sample.

Once the subtraction efficiency was shown to be satisfactory, DF-SF SSH cDNA products were cloned into a plasmid vector to generate a subtracted DF cDNA library. Before proceeding to the characterization of cDNA clones, a differential hybridization procedure was performed to identify false positive clones among the 837 bacterial colonies that were randomly selected. The subtracted (DF-SF, SF-DF) and unsubtracted (SF, DF) cDNA preparations were used as hybridization probes for the differential screening of the 837 cDNA clones spotted on four identical sets of macro-arrays. Representative differential screening results are illustrated in Figure 2. The differential hybridization screening yielded approximately 20% clones with no hybridization signal. The cDNA clones were classified as differentially expressed if they mainly hybridized with the DF-SF subtracted and DF unsubtracted probes, but not with the reverse subtracted probe (SF-DF) and only faintly (or not at all) with the SF unsubtracted probe, as determined by comparing signal intensities between the four identical macro-arrays. The differential screening procedure identified 298 cDNA clones as true positives, of which 201 were analyzed by sequencing, and 186 generated adequate sequencing results. Comparison of the obtained DNA sequences against GenBank databases resulted in the identification of 42 non-redundant cDNAs, of which 22 corresponded to known cDNAs, 13 were classified as uncharacterized cDNAs, BAC or EST clones, and 7 were novel sequences (Table 1). All the known genes and their frequency of identification during the differential screening are listed in Table 2. Several genes, such as CYP19, inhibin/activin β -A subunit (INHBA; [26]),

connexin-43 (CX43; [27]), and serine protease inhibitor E2 (SERPINE2; [16]) were already known to be more abundant in GC of DF compared to SF, and their detection therefore further validated the subtraction procedure. Also identified were genes that had previously been reported to be expressed in GC of ovarian follicles, including glutathione S-transferase alpha (GSTA-1, -2; [28]), nuclear receptor 5A2 (NR5A2; also named steroidogenic factor-2: SF-2; [23]), tumor necrosis factor α -induced protein 6 (TNFAIP6; also named tumor necrosis factor gene-6: TSG6; [29]), and chondroitin sulfate proteoglycan-2 (CSPG2; also named versican; [30]). The remaining 14 cDNAs had not previously been reported to be expressed in ovarian follicles.

Analysis of mRNA expression

To confirm that genes identified by SSH are differentially expressed in DF compared to SF, expression of selected genes was analyzed by virtual Northern using mRNA samples derived from GC of different stages of follicular development and CL from day 5 of the estrous cycle. For this procedure, mRNAs were reverse-transcribed into cDNAs, separated on agarose gel, and used to generate six membranes that were hybridized to six of the cloned cDNA inserts described in Table 2. The ApoER2 (also named low-density lipoprotein receptor-related protein-8: LRP-8) was mainly detected in the DF with a fourteen-fold higher expression level in DF compared to SF (Figure 3 A). The carboxypeptidase-D (CPD) mRNA was also mainly expressed in DF associated with a twenty-fold higher expression level in DF compared to SF (Figure 3 B). The CSPG2 mRNA was mainly expressed

in the DF, where a seven-fold higher expression level was measured in DF compared to SF (Figure 3 C). The 14-3-3 epsilon transcript was mainly expressed in the DF with a six-fold higher expression level in the DF compared to the SF (Figure 3 D). The regucalcin (RGN; also named senescence marker protein-30: SMP30) transcript was also expressed in all samples, and displayed an eight-fold higher expression level in the DF compared to the SF (Figure 3 E). The analyses showed an increase of at least fifty-five fold in SERPINE2 transcripts in DF compared to SF (Figure 3 F). A comparative RT-PCR assay was performed for the NR5A2 mRNA, which showed a weak signal by virtual Northern analysis (data not shown). We observed that NR5A2 transcript was increased in DF compared to SF, and its expression was maintained in OVU follicles but was reduced in CL (Figure 4). Furthermore, a similar analysis for pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) was performed as a positive control for higher expression in the DF group compared to SF. We observed that the PAPP-A transcript was more abundant in the DF compared to SF (Figure 4).

Discussion

In mono-ovulatory species, the mechanisms allowing a DF to be selected and ovulate in conditions where other follicles degenerate are not fully understood. Characterization of the specific subset of genes regulating final follicular growth provides valuable information concerning developmental events contributing to follicular selection and dominance. Available information pertaining to gene expression analysis in GC of small antral bovine follicles (≤ 4 mm) compared to the growing DF is limited, and although some key genes are known, it is clear that many more must be identified. To further understand the molecular basis for DF selection and growth, we performed a SSH screen designed to identify genes that are differentially expressed in GC of growing DF compared to non-selected SF (≤ 4 mm).

Screening the DF-SF subtracted cDNA library allowed the identification of genes like SERPINE2 [16], CYP19 [6-9], CX43 [27,31], and INHBA subunit [26, 32-33] that had previously been shown to be differentially expressed in GC of DF when compared to SF. The identification of these genes thus provides an important validation of the physiological model and the analytical techniques used herein. However, other expected genes that would have been expected to be differentially expressed were not identified in the DF-SF subtracted library. The exact reason for this is unknown and may vary from one gene to another. For a given gene, it may be related to its low level of expression, to the small difference in level of expression between the DF and SF, to the presence of isoforms, to the limited number of cDNA

clones analyzed or to the detection limits of the differential screening procedure. To verify this assumption, we compared the expression of PAPP-A mRNA in DF and SF, since PAPP-A is a long cDNA expressed at a low level and was recently shown to be differentially expressed in growing vs atretic follicles [24]. The analysis confirmed that PAPP-A mRNA is more abundant in growing DF compared to non-selected SF, providing further validation of our experimental model. Despite differences that were observed in IGF binding proteins in follicular fluid when bovine DF were compared to subordinate follicles [6-9], no difference in mRNA levels for IGFBP-2, -3 and -4 have been found in GC of DF vs subordinate follicles [34]. The latter mRNA study is in agreement with our present results since no IGFBP mRNA was found to be differentially expressed.

Other genes identified by the SSH procedure are already known to be expressed in GC of ovarian follicles, but no report has yet indicated that these genes are differentially expressed during follicular development. This group includes NR5A2, CSPG-2, TSG-6 and GSTA1-2. NR5A2 (also known as FTF/LRH-1) is a member of the NR5A orphan nuclear receptor subfamily, and has been shown to share a high degree of structural similarity with another member of this subfamily, NR5A1a or SF-1 [35]. NR5A1a modulates the transcriptional activity of many genes involved in a variety of metabolic and developmental processes including ovarian steroidogenic genes [36, 37]. NR5A2 transactivates the CYP7 and CYP19 genes and is believed to share the same DNA binding specificity as NR5A1a, suggesting a functional redundancy [38, 39]. Equine NR5A1a and NR5A2 have been characterized, and the expression of their mRNAs was studied in the follicle

during hCG-induced ovulation and luteinization [23]. Unexpectedly, NR5A2 is highly expressed in equine GC and CL compared to NR5A1a, thereby suggesting a more important role for NR5A2 in controlling steroidogenesis in GC than NR5A1. We report an increase of NR5A2 expression in bovine DF compared to SF suggesting a possible prominent role for NR5A2 in the control of steroid synthesis as the selected DF develops.

CSPG-2 (also named versican) is a member of the hyaluronan-binding proteoglycans termed hyalactins [40]. It is a large extracellular matrix proteoglycan with a versatile modular structure that interacts directly with cells or indirectly with molecules that are associated with cells. Versican regulates cell adhesion and survival, cell proliferation, cell migration and extracellular matrix assembly [41,42]. The central region of versican is encoded by two exons named α GAG and β GAG that specify chondroitin sulfate attachment. Four splice variants are described for versican mRNA, which correspond to V0 (containing α GAG and β GAG), V1 (β GAG), V2 (α GAG) and V3 (neither α GAG nor β GAG; [40]). We identified the V0/V1 isoforms in the DF since one of the cDNA fragments derived from the SSH analysis corresponded to the β GAG domain whereas the other corresponded to the 3'UTR region. Our mRNA expression analysis provided further evidence for the high molecular weight V0/V1 isoforms, and that V0/V1 expression is increased in the DF compared to the SF. While a previous report showed the presence of the V0/V1 versican isoforms in small antral follicles but not in primordial or preantral follicles [30], this is the first report of differential versican expression in DF vs SF.

In the rat, versican V0/V1 expression increases 4 to 6 hrs following induction with hCG [43]. However, in bovine GC, we have not observed an increase in versican V0/V1 expression 23 hrs post-hCG injection, suggesting that the regulation of versican expression may vary significantly between species. The spatio-temporal expression of versican isoforms should be further studied in the bovine species during the peri-ovulatory period, given its likely critical role in modifying the extracellular matrix to support the growth of the DF.

TNFAIP6 (also named TSG-6) was identified once in the DF cDNA subtracted library, and in a parallel study, we observed that TSG-6 mRNA was slightly increased in GC of DF compared to SF [44]. TSG-6 is a member of the Link module superfamily and binds to hyaluronan, a vital component of the extracellular matrix. TSG-6 expression is tightly regulated in different tissues, and is induced in response to extracellular matrix remodeling, inflammatory mediators, and ovulation [13,45]. A small mechanical strain imposed on vascular smooth muscles was shown to induce the expression of TSG-6 and versican, and promoted the aggregation of versican to hyaluronan [46]. Interaction between TSG-6, versican and hyaluronan may counteract mechanical force induced by the growth of the DF and contribute to modifications of the extracellular matrix surrounding the DF.

GSTA-1 and -2 subunits were also identified, and they correspond to a multigene family of related proteins that have been divided into five classes of alpha, mu, pi, sigma, and theta. The biological action of GSTs is to provide protection against cellular oxidative stress [47]. GSTA-1 and -2 mRNAs are coexpressed, and immunohistochemistry revealed that expression of GSTAs is

associated with GC and theca cells, and that levels of GSTA mRNAs are modulated by FSH and LH in bovine follicles during the peri-ovulatory period [28]. Expression of GSTA isoenzymes may thus be linked to cell types involved in steroid synthesis or metabolism and could be related to cellular oxidative stress induced by reactive oxygen species generated during steroid metabolism. Since steroidogenic activity increases as follicular development occurs, an increase in GSTA mRNA in healthy growing DF compared to SF, as shown in this study, would be expected.

The remaining 13 cDNAs identified in our SSH screening have not been previously shown to be expressed in the ovarian follicle. Among these, we believe that ApoER2, CPD, 14-3-3 epsilon and RGN in particular represent interesting novel candidate genes associated with follicular growth and dominance. ApoER2, which was the second most commonly identified cDNA clone in the DF subtracted library, belongs to the low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene family which includes LDLR, LDL-receptor-related protein (LRP), megalin and the very-low-DLR (VLDLR). The LDLR are cell surface receptors that are known to mediate the uptake of extracellular lipoprotein's lipid-rich cargo into the cell, and were recently shown to transduce extracellular signals and activate intracellular tyrosine kinase signaling [48,49]. ApoER2 differs from the other members of the LDLR family notably by its longer cytoplasmic domain that contains a protein-protein interaction domain involved in transmembrane signal transduction mechanisms [50]. Indeed, extracellular domain of VLDLR and ApoER2 have been shown to bind Reelin [51,52], triggering the phosphorylation of Dab1 bound to either ApoER2 or VLDLR [53, 54]. Furthermore, the ApoER2 contains a specific 59 amino acid proline-rich

region found in its cytoplasmic domain that interacts with the c-Jun N-terminal kinase interacting protein (JIP) family [55,56]. Our studies of ApoER2 in bovine follicles showed the highest expression of ApoER2 in GC of DF, and low levels in SF, hCG-treated preovulatory follicles and the CL. This pattern of expression contrasts markedly with the lipid requirements of ovarian steroidogenic cells, particularly in the CL [57,58]. Therefore, coupled with the aforementioned proposed role of ApoER2 in signal transduction, our observations suggest that in the ovary ApoER2 is likely to be involved in other functions than importing cholesterol for steroidogenesis. The characterization and further studies of the bovine ApoER2 isoforms in the ovary will be necessary to decipher its function in relation to follicular growth and dominance.

CPD is a carboxypeptidase E (CPE)-like enzyme which has been proposed to be involved in peptide processing, based on its presence in hormone-containing pituitary secretory vesicles [59]. Unlike other metallo-carboxypeptidases, CPD contains multiple carboxypeptidase domains and its expression is broadly distributed among mammalian tissues with highest levels in pituitary, brain and adrenal gland [59-64]. CPD is present in the *trans*-Golgi network (TGN), the secretory and reuptake pathways, and transiently on the cell surface [65-67]. Therefore, CPD is thought to function following the action of furin, proprotein convertase 7 and related endopeptidases in the processing of proteins that transit the secretory pathway within the TGN and immature vesicles [60]. However, the absence of CPD from mature secretory vesicles suggests that this is not the primary role of CPD. Instead, it is possible that CPD is involved in the processing of proteins that are secreted via

the constitutive pathway, such as growth factors and growth factor receptors (insulin, IGFs, IR, IGFR, etc.). Therefore, increased expression of CPD mRNA in GC of DF could be related to processing of growth factors and their receptors which are important for follicular development and differentiation.

The 14-3-3 protein family, first discovered as acidic proteins in the brain, is highly conserved in animals and nine isoforms have been identified. The exact function of 14-3-3 proteins is still not clear but they are known to inhibit cell cycle progression and apoptosis, and to act as stimulatory or inhibitory factors in many signal transduction pathways [68]. 14-3-3 epsilon has been shown to interact with activated type I insulin-like growth factor-receptor (IGF1R) via phosphoserine residues at the carboxy-terminus of the receptor, as well as with insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in a phosphorylation dependent manner [69]. The potential functional roles which 14-3-3 epsilon may play in IGF1R and IRS-1 mediated signaling remain to be elucidated. Interestingly, IGF-1, which binds the IGF1R, is known to stimulate granulosa and theca cell proliferation and steroidogenesis in response to gonadotropins [70,71]. Also, IGF1R is expressed in GC and increases in the later stages of DF development [72,73]. Therefore, the increase of 14-3-3 epsilon mRNA observed in GC of the DF compared to SF suggests that 14-3-3 epsilon may modulate the IGF1 intracellular cascade during follicular development.

RGN is a calcium binding protein also called senescence marker protein-30 (SMP30) [74,75], and is expressed mainly in hepatocytes and renal tubular epithelia [74]. By RT-PCR analysis, RGN/SMP30 transcripts have been detected in additional tissues including the brain, lung, adrenal gland, stomach, ovary, testis,

and epidermis [76]. The amounts of RGN/SMP30 increase during tissue-maturing stages and adulthood but decrease with aging in the livers and kidneys of rats [74,77]. RGN/SMP30 has a reversible effect on the activation and inhibition of various enzymes by regulating Ca^{2+} in the rat liver [78]. Additional studies demonstrate that RGN/SMP30 rescues Hep G2 cells from apoptosis by enhancing plasma membrane Ca^{2+} -pumping activity [79]. Furthermore, RGN/SMP30 knockout mouse livers are highly susceptible to apoptosis, suggesting that RGN/SMP30 has a protective role in cell injury such as apoptosis and hypoxia [76]. In aged tissues, decrease of RGN/SMP30 may induce dysregulation of Ca^{2+} homeostasis, which could result in the modification of the signaling system and therefore be responsible for the age-associated deterioration of cellular functions. Our results show that RGN/SMP30 mRNA expression increases with follicular development to reach highest levels within the CL. Since Ca^{2+} is a second messenger common to several signal transduction pathways that lead to cell proliferation, differentiation and apoptosis, RGN/SMP30 could be involved in proper Ca^{2+} homeostasis during follicular development and luteal function.

In summary, we have identified several genes that may contribute towards understanding the mechanisms involved with final ovarian follicular growth, selection and dominance in mono-ovulatory species. It will be necessary to further analyze their spatio-temporal expression pattern at the mRNA and protein levels in the developing ovarian follicle.

Acknowledgments

This work was supported by a CORPAQ grant from the “Ministère de l’agriculture, des pêcheries et de l’alimentation du Québec” and a Discovery Grant to JGL from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors would like to thank Mrs Manon Salvas for her technical assistance during nucleic acid sequencing, and Dr Derek Boerboom and Dr Alan Goff (Université de Montréal) for their constructive comments and corrections made to the manuscript.

References

- 1- **Lussier JG, Matton P, Dufour JJ.** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 1987; 81:301-307.
- 2- **Lussier JG, Matton P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, Carruthers TD.** Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J Reprod Fertil* 1994; 102:95-105.
- 3- **Markström E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H.** Survival factors regulating ovarian apoptosis—dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123:23–30.
- 4- **Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R.** Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 1996; 55:68-74.
- 5- **Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P.** Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 1991; 91:81-89.
- 6- **Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM.** Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001; 65:648-654.
- 7- **Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K.** Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001;65:638-647.
- 8- **Mihm M, Austin EJ.** The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23:155-166.
- 9- **Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D.** Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23:139-154.
- 10- **Bao B, Thomas MG, Williams GL.** Regulatory roles of high-density and low-density lipoproteins in cellular proliferation and secretion of progesterone and insulin-like growth factor I by enriched cultures of bovine small and large luteal cells. *J Anim Sci* 1997; 75:3235-3245.

- 11- **Evans AC, Fortune JE.** Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1997;138:2963-2971.
- 12- **Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ.** Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 547-555.
- 13- **Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL.** Ovulation: New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:69-92.
- 14- **Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y-F C, Siebert PD.** Suppression subtractive hybridization : A versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303:349-379.
- 15- **Sirois J.** Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 1994; 135:841-848.
- 16- **Bédard J, Brûlé S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG.** Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Molec Reprod Dev* 2003; 64:152-165.
- 17- **Sambrook J, Russell DW.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- 18- **Endege WO, Steinmann KE, Boardman LA, Thibodeau SN, Schlegel R.** Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 1999; 26:542-550.
- 19- **Zhumabayeva B, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD.** Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques* 2001; 30 : 158-163.
- 20- **Lussier JG, Sirois J, Price C, Carrière P, Silversides DW.** Research in genomics applied at the undergraduated level: When research meets teaching objectives. In: Program of the 34th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, Ottawa, ON. *Biol Reprod* 2001; 64(Suppl 1): Abstract 71.

- 21- **Hinshelwood MM, Corbin CJ, Tsang PC, Simpson ER.** Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 1993; 133:1971-1977.
- 22- **Lévesque V, Fayad T, Ndiaye K, Diouf MN, Lussier JG.** 2003. Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* 2003; 35:72-78.
- 23- **Boerboom D, Pilon N, Behdjani R, Silversides DW, Sirois J.** Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process. *Endocrinology* 2000; 141:4647-4656.
- 24- **Mazerbourg S, Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Conover CA, Laurendeau I, Vidaud M, Tosser-Klopp G, Zapf J, Monget P.** Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology* 2001; 142:5243-5253.
- 25- **JMP.** Software for statistical visualization on the Apple McIntosh. Version 2. SAS Institute Inc. Cary, NC; 1989.
- 26- **Ireland JL, Ireland JJ.** Changes in expression of inhibin/activin alpha, beta A and beta B subunit messenger ribonucleic acids following increases in size and during different stages of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows. *Biol Reprod* 1994; 50:492-501.
- 27- **Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, Fléchon JE.** Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev* 2000; 57:60-66.
- 28- **Rabahi F, Brûlé S, Sirois J, Beckers JF, Silversides DW, Lussier JG.** High expression of bovine alpha glutathione S-transferase (GSTA1, GSTA2) subunits

- is mainly associated with steroidogenically active cells and regulated by gonadotropins in bovine ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140:3507-3517.
- 29- **Yoshioka S, Ochsner S, Russell DL, Ujioka T, Fujii S, Richards JS, Espey LL.** Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Endocrinology* 2000; 141:4114-4119.
- 30- **McArthur ME, Irving-Rodgers HF, Byers S, Rodgers RJ.** Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000; 63:913-924.
- 31- **Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT.** Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32 and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine* 1999; 10:43-51.
- 32- **Sunderland SJ, Knight PG, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ.** Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 1996; 54:453-462.
- 33- **Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Kot K.** Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor 1 in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biol Reprod* 2002; 67:14-19.
- 34- **Voge JL, Allen DT, Malayer JR, LJ Spicer.** Relationships among levels of granulosa cells insulin-like growth factor binding-protein (IGFBP) mRNAs and follicular fluid IGFBPs and steroids in dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. In: Program of the 35th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, Baltimore, MD. *Biol Reprod* 2002; 66 Suppl. 1 : abstract 281.
- 35- **Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J.** The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* 1993; 13:5794-5804.

- 36- **Parker KL, Schimmer BP.** Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 1997; 18:361-377.
- 37- **Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH.** Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem* 1997; 272:7960-7967.
- 38- **Nitta M, Ku S, Brown C, Okamoto AY, Shan B.** CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6660-6665.
- 39- **Clyne CD, Speed CJ, Zhou J, Simpson ER.** Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J Biol Chem* 2002; 277:20591-20597.
- 40- **Schmalfeldt M, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR.** Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *J Biol Chem* 1998; 273:15758-15764.
- 41- **Kresse H, Schönherr E.** Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol* 2001; 189:266-274.
- 42- **Wight TN.** 2002. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14:617-623.
- 43- **Russell DL, Ochsner SA, Hsieh M, Mulders S, Richards JS.** Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology* 2003; 144:1020-1031.
- 44- **Lévesque V, Fayad T, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG.** 2002. Identification of hCG-induced gene expression in granulosa cells of bovine preovulatory follicles using suppressive subtractive hybridization. In: Program of the 35th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, Baltimore, MD. *Biol Reprod* 2002; 66 Suppl. 1: abstract 275.
- 45- **Milner CM, Day AJ.** TSG-6 : a multifunctional protein associated with inflammation. *J Cell Sci* 2003; 116:1863-1873.

- 46- **Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, Potter-Perigo S, Briggs WH, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Wight TN.** Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276:13847-13851.
- 47- **Ketterer B.** Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radic Res* 1998; 28:647-658.
- 48- **Willnow TE, Nykjaer A, Herz J.** Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999; 1:E157-162.
- 49- **Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS.** Diverse roles for the LDL receptor family *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:66-74.
- 50- **Kim DH, Magoori K, Inoue TR, Mao CC, Kim HJ, Suzuki H, Fujita T, Endo Y, Saeki S, Yamamoto TT.** Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J Biol Chem* 1997; 272:8498-8504.
- 51- **Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J.** Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 1999; 24:481-489.
- 52- **D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T.** Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 1999; 24:471-479.
- 53- **Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J.** Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1998; 273:33556-33560.
- 54- **Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J.** 1999. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 1999; 97:689-701.
- 55- **Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ.** The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19:7245-7254.

- 56- **Stockinger W, Brandes C, Fasching D, Hermann M, Gotthardt M, Herz J, Schneider WJ, Nimpf J.** 2000. The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J Biol Chem* 2000; 275:25625-25632.
- 57- **Zerbinatti CV, Dyer CA.** Apolipoprotein E peptide stimulation of rat ovarian theca cell androgen synthesis is mediated by members of the low density lipoprotein receptor superfamily. *Biol Reprod* 1999; 61:665-672.
- 58- **LaVoie HA, Garmey JC, Day RN, Veldhuis JD.** Concerted regulation of low density lipoprotein receptor gene expression by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in porcine granulosa cells : promoter activation, messenger ribonucleic acid stability, and sterol feedback. *Endocrinology* 1999; 140:178-186.
- 59- **Song L, Fricker LD.** Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary. *J Biol Chem* 1995; 270:25007-25013.
- 60- **Song L, Fricker LD.** Tissue distribution and characterization of soluble and membrane-bound forms of metallo-carboxypeptidase D. *J Biol Chem* 1996; 271:28884-28889.
- 61- **Song L, Fricker LD.** Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metallo-carboxypeptidase. *J Biol Chem* 1997; 272:10543-10550.
- 62- **Tan F, Rehli M, Krause SW, Skidgel RA.** Sequence of human carboxypeptidase D reveals it to be a member of the regulatory carboxypeptidase family with three tandem active site domains. *Biochem J* 1997; 327:81-87.
- 63- **Ishikawa T, Murakami K, Kido Y, Ohnishi S, Yazaki Y, Harada F, Kuroki K.** Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human and mouse gp180-carboxypeptidase D-like enzyme. *Gene* 1998; 215:361-370.
- 64- **Varlamov O, Eng FJ, Novikova EG, Fricker LD.** Localization of metallo-carboxypeptidase D in AtT-20 cells. Potential role in prohormone processing. *J Biol Chem* 1999; 274:14759-14767.

- 65- **Varlamov O, Fricker LD.** Intracellular trafficking of metalloproteinase D in AtT-20 cells: localization to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface. *J Cell Sci* 1998; 111:877-885.
- 66- **Eng FJ, Varlamov O, Fricker LD.** Sequences within the cytoplasmic domain of gp180/carboxypeptidase D mediate localization to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell.* 1999; 10:35-46.
- 67- **Kalinina E, Varlamov O, Fricker LD.** Analysis of the carboxypeptidase D cytoplasmic domain: Implications in intracellular trafficking. *J Cell Biochem* 2002; 85:101-111.
- 68- **Van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP.** 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 2001; 23:936-946.
- 69- **Craparo A, Freund R, Gustafson TA.** 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem* 1997; 272:11663-11669.
- 70- **Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R.** Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Endocrinol* 1994; 143:157-164.
- 71- **Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG.** Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion and inhibin-related peptides by non-luteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 2001; 65:1020-1028.
- 72- **Perks CM, Peters AR, Wathes DC.** Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1999; 116:157-165.
- 73- **Armstrong DG, Gutierrez CG, Baxter G, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ, Hogg CO, Webb R.** Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 2000; 165:101-113.

- 74- **Fujita T, Uchida K, Maruyama N.** Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1116:122-128.
- 75- **Shimokawa N, Yamaguchi M.** Expression of hepatic calcium-binding protein regucalcin mRNA is mediated through Ca^{2+} /calmodulin in rat liver. *FEBS Lett* 1993; 316:79-84.
- 76- **Ishigami A, Fujita T, Handa S, Shirasawa T, Koseki H, Kitamura T, Enomoto N, Sato N, Shimosawa T, Maruyama N.** Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor- α - and Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 2002; 161:1273-1281.
- 77- **Fujita T, Shirasawa T, Uchida K, Maruyama N.** Gene regulation of senescence marker protein-30 (SMP30): coordinated up-regulation with tissue maturation and gradual down-regulation with age. *Mech Ageing Dev* 1996; 87:219-229.
- 78- **Yamaguchi M.** A Novel Ca^{2+} -binding protein regucalcin and calcium inhibition; regulatory role in liver cell function. In: Kohama K (Ed), *Calcium Inhibition* Sci Press and CRC Press, Tokyo and Boca Raton, FL; 1992:19-41.
- 79- **Fujita T, Inoue H, Kitamura T, Sato N, Shimosawa T, Maruyama N.** Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca^{2+} -pumping activity in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250:374-380.

Figure 1. Evaluation of subtraction efficiency.

A) Reduction of GAPD cDNA following subtraction in the DF-SF sample. PCR was performed on DF-SF subtracted and DF unsubtracted PCR samples using GAPD-specific primers, and aliquots were collected at increasing number of PCR cycles as indicated. In the unsubtracted sample, the GAPD cDNA fragment (710 pb) was detected after 15 PCR cycles, but could only be observed following 20 PCR cycles in the subtracted sample. **B)** Enrichment of CYP19 cDNA following subtraction in the DF-SF sample. PCR was performed on the indicated samples using CYP19-specific primers. PCR product aliquots were collected at increasing number of PCR cycles as indicated. The CYP19 DNA fragment (520 pb) was detected following 13 cycles after subtraction but not until 18 cycles in the corresponding unsubtracted DF sample.

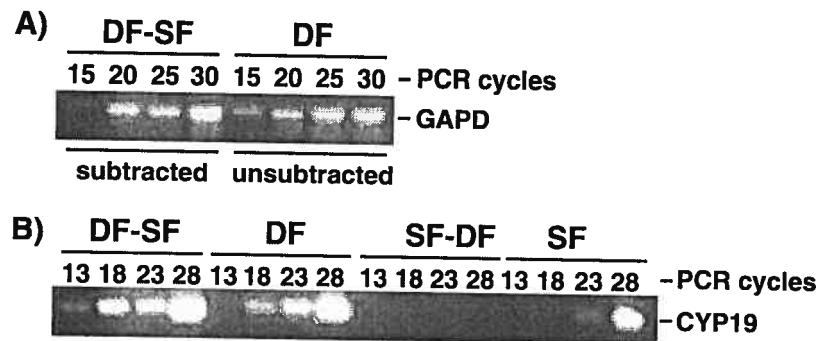


Fig.1; Fayad T & al.

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

PCR-amplified cDNA fragments obtained by SSH were dot blotted onto four identical sets of membranes. The macro-arrays were then hybridized with four different probes: subtracted DF-SF cDNAs (**A**), unsubtracted DF cDNAs (**B**), reverse-subtracted SF-DF cDNAs (**C**), and unsubtracted SF cDNAs (**D**). The two upper left dots served as internal controls: 1 = CYP19 (positive control), 2 = GAPD (negative control). Examples of cDNA clones that were preferentially expressed in DF compared to SF (*i.e.* positive clones) are indicated by an arrow for ApoER2 or arrowhead for INHBA.

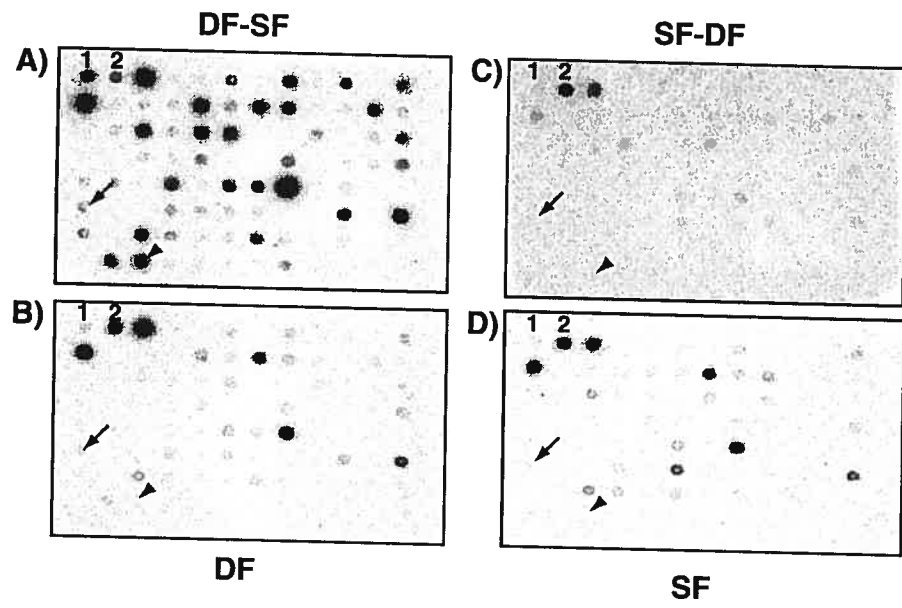


Fig.2; Fayad T & al.

Table 1. Summary of the subtracted DF-SF cDNA clones that were sequenced.

cDNA clones	Number of nonredundant clones/ Total number of clones sequenced
Known genes ^a	22/141
Uncharacterized sequences ^b	13/26
Unknown sequences ^c	7/19
Total clones sequenced	42/186

^a Sequences with > 85% identity to known genes.

^b Sequences with significant homology to BAC clones, cDNAs or EST ($E < e^{-10}$).

^c Sequences not found in the GenBank database.

TABLE 2. Identity of cDNA clones found to be differentially expressed by SSH in bovine granulosa cells of DF compared to SF.

Sequence identification	Frequency	Accession number	% identity ^a	Expected E value	Description ^b
ApoER2	32	D50678	89%	e ⁻¹³⁰	HS mRNA for apolipoprotein E receptor 2
CYP19	35	NM_174305	99%	0	BT cytochrome P450 aromatase, family XIX
CPD	4	U65090	91%	e ⁻¹⁸⁰	HS carboxypeptidase D
CSPG2	1	AF060456	96%	0	BT versican V0 splice-variant precursor, mRNA
CX43	3	AF060457	96%	0	BT versican V1 splice-variant precursor, mRNA
DDX6	1	J05535	99%	0	BT vascular smooth muscle connexin 43
		NM_004397	97%	0	HS DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 6 (RNA helicase, 54 kDa)
14-3-3 epsilon	2	AF043735	99%	e ⁻¹³⁰	BT 14-3-3 epsilon
GSTAI	1	U49179	90%	9e ⁻⁹⁰	BT glutathione S-transferase subunit isoform 1
GSTA2	1	AF027386	93%	9e ⁻⁹³	BT glutathione-S-transferase subunit isoform 2
HSPC155	1	NM_016406	88%	4e ⁻⁶¹	HS hypothetical protein HSPC155
INHBA	31	NM_174363	97%	2e ⁻⁸²	BT inhibin, beta A (activin A, activin AB)
MacGAP	1	NM_033515	90%	e ⁻¹⁴¹	HS MacGAP protein
MYL6	1	X54977	98%	0	BT mRNA for 17 kDa myosin light chain
NAD(+)-IDH	1	U07980	96%	0	BT NAD+-dependent isocitrate dehydrogenase subunits 3 and 4
RGN	1	AB035446	99%	e ⁻¹⁶⁸	BT mRNA for regucalcin
ROBO2	1	XM_031246	91%	e ⁻¹¹¹	HS roundabout axon guidance receptor homol. 2
SERPINE2	19	AF251153	97%	0	BT serine protease inhibitor-E2
SF-2	1	AF203913	89%	2e ⁻⁷⁰	EC steroidogenic factor 2
SFPQ	1	XM_204051	89%	9e ⁻³¹	MM splicing factor proline/glutamine rich
SIP1	1	AY029472	87%	4e ⁻⁴⁴	HS smad-interacting protein-1
TNFAIP6	1	NM_007115	91%	e ⁻¹²¹	HS tumor necrosis factor α -induced protein 6
VTI1B	1	NM_006370	91%	2e ⁻⁷⁰	HS vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B (yeast)
cDNA	6	AB047862	88%	7e ⁻²⁸	MF brain cDNA (clone:QnpA-10795)
		ABO49896	(115/130)	7e ⁻²⁸	MF brain cDNA, (clone:QnpA-19444)
cDNA	4	AC005027	91%	e ⁻¹¹²	HS BAC clone GS1-512I21 from 7p14-p12
		AK001903	(299/326)	e ⁻¹¹²	HS cDNA FLJ11041 fis, clone PLACE1004405
BAC clone	1	AC098687	90%	1e ⁻²⁹	BT BAC clone rp42-194o5 (108/120)

BAC clone	1	AC010878	84% (194/230)	2e ⁻³⁷	HS BAC clone RP11-230E20 from 2
BAC clone	1	AC073641	85% (104/121)	5e ⁻²⁰	HS BAC clone RP11-368E14 from 2
DNA sequence cDNA	3 1	AL606760 AC087860	85% (132/154) 87% (138/158)	6e ⁻²⁸ 1e ⁻³²	HS DNA sequence from clone RP5-1024G6 on chromosome 1 BT clone RP42-135P2
EST	3	BI848864	99%	e ⁻¹⁷⁴	BT EST MARC 2BOV
EST	2	CB449943	(329/332) 98%	e ⁻¹²⁵	BT EST MARC 6BOV
EST	1	BE845535	(243/246) 94%	4e ⁻⁸³	BT EST MARC 5BOV
EST	1	CB463791	(192/203) 96%	6e ⁻⁸⁰	BT EST MARC 6BOV
EST	1	AW670360	(185/192) 100%	e ⁻¹³⁴	BT EST MARC 1BOV
EST	1	CB535208	(244/244) 99%	0	BT EST MARC 6BOV
EST	13	CF751997	(472/475) No match		BT EST new
EST	1	CF751998	No match		BT EST new
EST	1	CF751999	No match		BT EST new
EST	1	CF752000	No match		BT EST new
EST	1	CF752001	No match		BT EST new
EST	1	CF752002	No match		BT EST new
EST	1	CF752003	No match		BT EST new

a. % identity represents homology estimates of bovine cDNA SSH fragments with nucleotide sequences in GenBank databank (NR or EST) via BLAST search. The numbers in brackets represent the number of nucleotides of the SSH fragments that are identical with databank sequences.

b. BT: Bos taurus; EC: Equus caballus; EST: expressed sequence tag; HS: Homo sapiens; MM: Mus musculus.

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

Total RNA was extracted from bovine GC from ≤ 4 mm follicles (SF), dominant follicles at day 5 of the estrous cycle (DF), preovulatory follicles 22 to 23 h after injection of hCG (OVU) and CL from day 5 of the estrous cycle, and was employed in mRNA expression analyses using the virtual Northern technique as described under "Materials and Methods". GAPD was used as a control gene, and showed no significant difference in mRNA expression levels between samples. Gene-specific signals were normalized with corresponding GAPD signals for each sample. **A)** Expression of ApoER2 displayed a fourteen-fold higher expression level in DF compared to SF ($P < 0.0001$); **B)** Expression of CPD mRNA was twenty-fold higher in DF compared to SF ($P < 0.0001$); **C)** Expression of CSPG2 mRNA was seven-fold higher in DF compared to other samples ($P < 0.0001$); **D)** Expression of 14-3-3 epsilon mRNA was six-fold higher in DF compared to SF ($P < 0.0001$); **E)** Expression of RGN mRNA was eight-fold higher in DF compared to SF ($P < 0.0001$); **F)** Expression of SERPINE2 mRNA was fifty-fold higher in DF compared to SF ($P < 0.0001$). Probability values for each one-way ANOVA analysis are specified in brackets, and group means that differed are indicated by an asterisk. Different letters denote samples that are significantly different ($P < 0.05$) when Tukey-Kramer multiple comparison tests were performed. Data are presented as least-square means \pm SEM, and the number of independent samples per group is indicated in brackets.

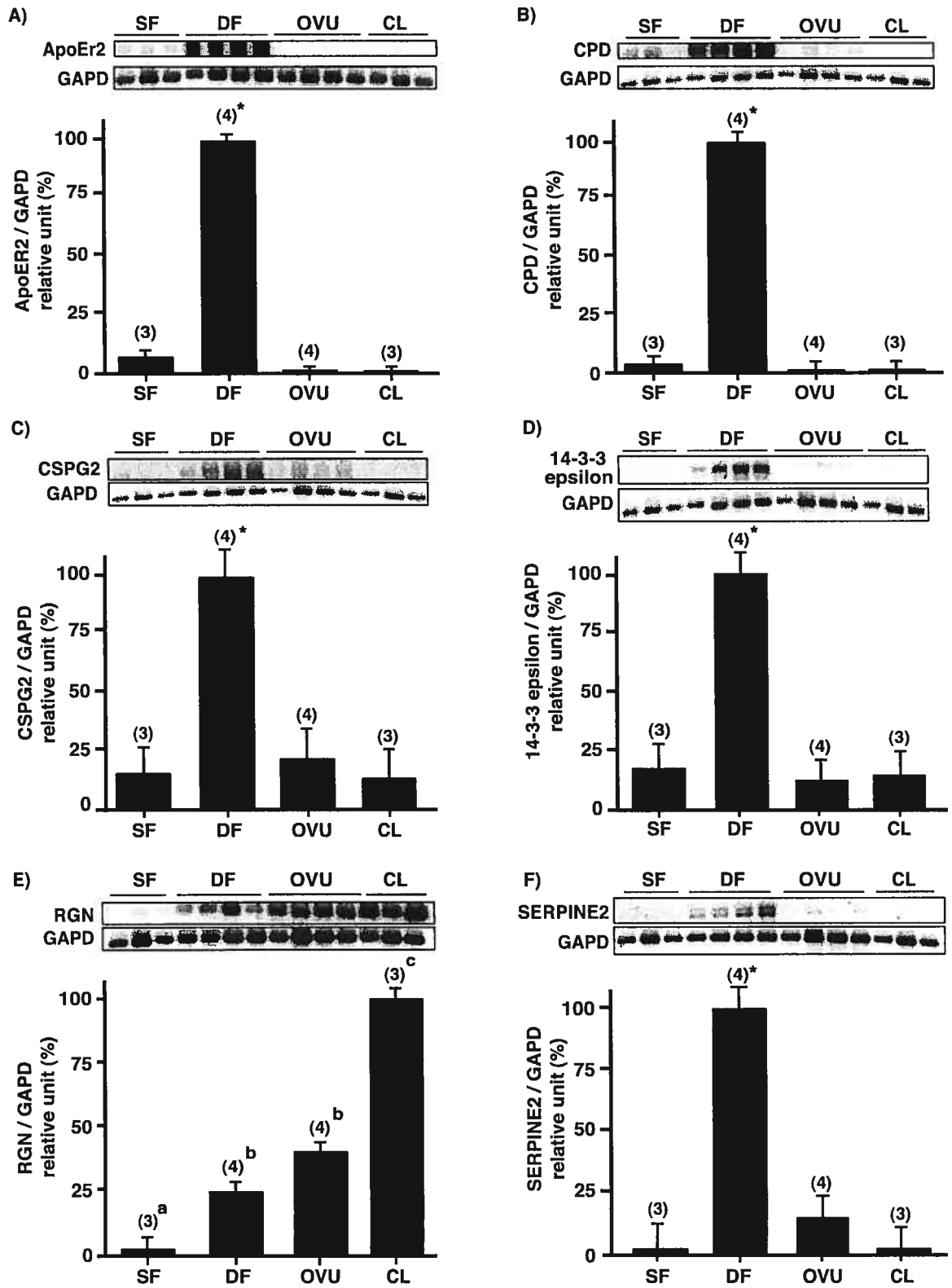


Fig. 3: Fayad & al.

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

Total RNA was extracted from bovine GC from ≤ 4 mm follicles (SF), dominant follicles at day 5 of the estrous cycle (DF), preovulatory follicles 22 to 23 h after injection of hCG (OVU) and CL from day 5 of the estrous cycle, and was employed in mRNA expression analyses using RT-PCR as described under “Materials and Methods”. GAPD was used as a control gene, and showed no significant differences between samples. Gene-specific signals were normalized with corresponding GAPD signals for each sample. PAPP-A and NR5A2 are represented by filled and open boxes, respectively. Expression of PAPP-A mRNA was 7.3 fold higher in DF compared to SF ($P < 0.0001$). Expression of NR5A2 mRNA was 6.2 fold higher in DF compared to SF ($P < 0.0001$). Probability values for each one-way ANOVA analysis are specified in brackets. Different letters specify means that are significantly different ($P < 0.05$) when Tukey-Kramer multiple comparison tests were performed. Data are presented as least-square means \pm SEM, and the number of independent samples per group is indicated in brackets.

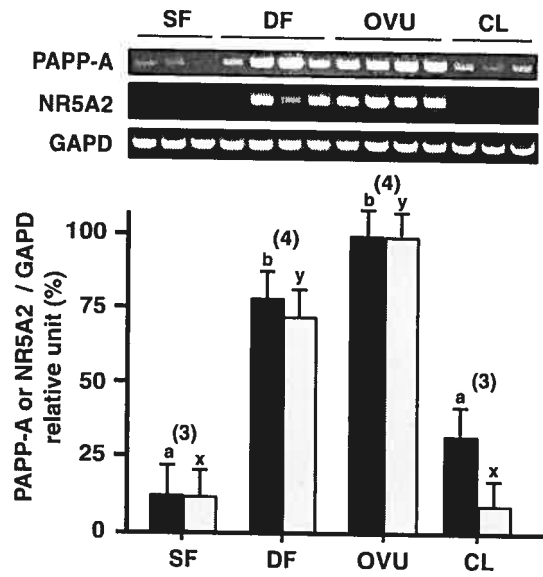


Fig.4; Fayad T & al.

CHAPITRE 3

ARTICLE # 2: Low-density lipoprotein receptor-related 8 (LRP8) is upregulated in granulosa cells of bovine dominant follicle: molecular characterization and spatio-temporal expression studies.

Accepté pour publication dans *Biology of Reproduction*

**LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED 8 (LRP8) IS UPREGULATED
IN GRANULOSA CELLS OF BOVINE DOMINANT FOLLICLE: MOLECULAR
CHARACTERIZATION AND SPATIO-TEMPORAL EXPRESSION STUDIES**

Tania Fayad¹, Réjean Lefebvre¹, Johannes Nimpf²,

David W. Silversides¹ and Jacques G. Lussier¹

¹Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6, and the ²Max F. Perutz Laboratories, Department of Medical Biochemistry, Medical University of Vienna, Dr. Bohrgasse 9/2, A-1030 Vienna, Austria.

Short title: Expression of LRP8 in granulosa cells

Address correspondence to: Jacques G. Lussier, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6; Tel. 450-773-8521 (ext. 8363); Fax. 450-778-8103; XXXXXXXXXX

Keywords: gene expression, granulosa cell, follicle, lipoprotein receptor, LRP8, ApoER2, LDLR, VLDLR, RELN, MAPK8IP1.

Abstract

The low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 8 (LRP8) is a member of the LDL receptor family that acts in endocytosis and in signal transduction. We cloned the full-length bovine *LRP8* cDNA in granulosa cells (GC) of dominant follicle (DF) as well as several *LRP8* mRNA splicing variants, including a variant containing a proline-rich cytoplasmic insert (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷) involved in intracellular signaling. Expression of the A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ variant was analyzed in GC of follicles at different developmental stages: small follicle (SF; 2-4 mm), DF at day 5 (D5) of the estrous cycle, ovulatory follicles (OF) 24 h after hCG injection, and corpus luteum (CL) at D5. RT-PCR results show that expression is predominant in GC of DF compared to other follicles and CL ($P < 0.0001$) whereas other related receptors such as *LDLR* and *VLDLR* expression does not differ. Temporal analyses of follicular walls from OF following hCG treatment reveal a decrease of *LRP8* mRNA expression starting 12 h post-hCG treatment ($P < 0.0001$). LRP8 protein is exclusively localized in GC with highest levels in DF when compared to SF ($P < 0.05$). We show that *RELN* mRNA, encoding an LRP8 ligand, is highly expressed in theca of DF when compared to OF ($P < 0.004$), whereas *MAPK8IP1* mRNA, encoding an LRP8 intracellular interacting partner is expressed in GC of DF. These results demonstrate the differential expression of *LRP8*, *RELN* and *MAPK8IP1* mRNAs during final follicular growth and ovulation, and suggest that a RELN/LRP8/MAPK8IP1 interaction may regulate follicular growth.

Introduction

During the bovine estrous cycle, two to three sequential waves of follicular development are observed, each producing a dominant follicle capable of ovulating if luteal regression occurs. Each follicular wave is preceded by an increase in circulating follicle-stimulating hormone (FSH) concentrations that initiates the recruitment of 7-11 antral follicles to grow larger than 3-4 mm in diameter [1,2]. With declining FSH concentrations, the number of growing follicles is reduced until only one follicle is selected to continue its development to become the dominant follicle (DF); meanwhile, subordinate follicles degenerate by apoptosis. The DF is responsible for the maintenance of FSH concentrations below the threshold requirements of smaller follicles through increased secretion of estradiol and inhibin that negatively regulate FSH secretion [2-3]. At basal circulating FSH concentration, the DF ensures its growth by the expression of molecular determinants, such as the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR), cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1), growth factors belonging to the inhibin family, and members of the insulin-like growth factor system that synergize the action of gonadotropins. These factors were shown to be differentially expressed in granulosa cells (GC) at the mRNA and/or protein levels in relation to the development of the DF [2,4-7]. Despite the identification of many important factors, the mechanisms allowing a DF to be selected, to pursue its growth in the presence of low circulating FSH concentration and to potentially ovulate, are still not fully understood.

Identification of genes that were upregulated in GC of growing DF compared to non-selected small follicles (2-4 mm) was accomplished by suppression subtractive hybridization (SSH) [6], and allowed the isolation of a differentially expressed cDNA fragment corresponding

to bovine low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (*LRP8*), also known as apolipoprotein E receptor 2 (*ApoER2*). A similar study identified *LRP8* as preferentially expressed in bovine DF compared to subordinate follicles [8]. *LRP8* is a member of the low-density lipoprotein (LDL) receptor protein family, which includes the LDL receptor (LDLR) and the very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR). These cell surface receptors are known to mediate the uptake of lipid-rich cargo of extracellular lipoproteins into the cell, but have also been shown to transduce extracellular signals and activate intracellular tyrosine kinase signaling [9,10]. Several splicing variants of *LRP8* mRNA have been detected and predicted to encode proteins that lack regions of the extracellular ligand-binding domain, the threonine and serine-rich domain and the 59 amino acid proline-rich cytoplasmic insert that interacts with the mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1 (MAPK8IP1; also known as the c-Jun N-terminal kinase interacting protein 1, JIP-1) [11,12]; at present the functional significance of these splicing variants is not fully understood [13-16]. Extracellular binding of the natural ligand of *LRP8*, reelin (RELN), results in the phosphorylation of an intracellular protein, disabled-1 (DAB1), and activation of down-stream signaling pathways. Defects in these signaling cascades, as in *lrp8*-deficient mice, cause developmental defect such as abnormal layering of neurons in the cortex, hippocampus, and cerebellum [17,18], and learning deficiency in adults [16]. In humans, expression of *LRP8* mRNA has been detected in the brain and placenta, whereas in rabbits expression has been found in the brain and testis, and to a much lesser extent, in the ovary [13]. Male *lrp8*-deficient mice exhibit infertility and *lrp8* is required for sperm maturation [18,19]. Since an mRNA expression profiling study [6] identified a cDNA fragment that corresponded to *LRP8* in GC of bovine DF, we hypothesized that expression of *LRP8* is associated with follicular dominance. The objectives of this study were to clone the

corresponding full-length bovine *LRP8* cDNA in GC, to analyze the expression of potential *LRP8* mRNA isoforms, to study the spatio-temporal expression profile of *LRP8* mRNA and protein using an *in vivo* model of bovine follicles collected at different developmental stages, and to explore the expression of LRP8-interacting proteins such as *RELN*, *MAPK8IP1*, *MAPK8IP2* and *DABI mRNA* in dominant follicles.

Materials and Methods

Experimental animal model, tissue collection and RNA isolation

Bovine ovarian follicles and corpora lutea (CL) were isolated at specific stages of the estrous cycle from normal cyclic crossbred heifers that were held at the large animal complex of the Faculty of Veterinary Medicine, as previously described [6,20]. Briefly, estrous cycles were synchronized with PGF_{2α} (25 mg, im; Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI) and ovarian follicular development was monitored by daily transrectal ultrasonography until ovariectomy. Dominant follicles (DF; n = 4 cows) were defined as > 8 mm and growing, by ultrasonographic measurement while subordinate follicles were either static or regressing. Dominant follicles were obtained on the morning of day 5 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus) by ovariectomy (via colpotomy). Ovulatory follicles (OF) were obtained following injection of 25 mg of PGF_{2α} on day 7 of the synchronized estrous cycle to induce luteolysis, thereby maintaining the development of the DF of the first follicular wave and transforming it into a preovulatory follicle. An ovulatory dose of hCG (3000 IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC) was injected 36 h after the induction of luteolysis, and the ovary bearing the hCG-induced OF was collected by ovariectomy at 0, 6, 12, 18 and 24 h after hCG injection (n = 2-4 cows/time point). Follicles were dissected into preparations of follicular wall (theca interna with attached GC) [20] or further dissected into separate isolates of GC or theca cells (TC) preparations [6]. Ovariectomies were also performed on day 5 of the synchronized estrous cycle to obtain CL (n = 3 cows). Additionally, GC were collected from 2-4 mm follicles obtained from slaughterhouse ovaries representing a total of three pools of 20 small follicles (SF). These experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. Total RNA was isolated from tissues as previously described [21]. The concentration

of total RNA was quantified by measuring optical density at 260 nm, and quality was evaluated by visualizing the 28S and 18S ribosomal bands following electrophoretic separation on a formaldehyde denaturing agarose gel.

Cloning of the bovine LRP8 cDNA

Three strategies were used to clone the bovine *LRP8* cDNA. First, the size of the full-length bovine *LRP8* cDNA was estimated at 4 kb from a previous virtual Northern blot analysis [6]. Thus, to construct the size-selected cDNA library, total RNA was first isolated from GC of DF obtained at day 5 of the estrous cycle and then transformed into cDNA by the SMART PCR cDNA synthesis method (BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON) [6]. The cDNAs were size fractionated by agarose gel electrophoresis, and cDNAs from 3.5 to 4.5 kb were purified to construct a size-selected cDNA library based on the pDrive plasmid (Qiagen PCR cloning kit; Qiagen, Mississauga, ON) as described [22]. The cDNA library was then screened by radioactive hybridization [22] with a bovine *LRP8* probe (500 bp) generated from a previous SSH screening experiment [6]. Positive *LRP8* hybridizing bacterial colonies were grown, their plasmid content was isolated (QIA-prep, Qiagen), and the size of the cloned cDNA was analyzed following *EcoRI* digestion and gel electrophoresis analysis. The cDNAs were sequenced via the dideoxy sequencing method (Big Dye Terminator 3.0; ABI Prism, Applied BioSystem, PE, Branchburg, NJ) and analyzed on an ABI Prism 310 sequencer (Applied Biosystem). Nucleic acid sequences were analyzed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) against GenBank data banks.

Since the bovine *LRP8* cDNA obtained was incomplete at the 5'-end, the 5'-RACE system, version 2.0 (Invitrogen, Burlington, ON) was used as directed by the manufacturer.

Reverse transcription was performed using 2 μ g of total RNA isolated from GC of DF and the bovine *LRP8* antisense primer (5'-ATGGGCTTCTGCCAGCAACGG-3'). After terminal deoxynucleotidyl transferase tailing, the first PCR was performed with the sense abridged anchor primer (5'-RACE system, Invitrogen) and the bovine *LRP8* antisense primer (5'-TAGCCAGGGTGGCACTCGC-3'). The second nested PCR reaction was performed with the sense universal amplification primer (5'-RACE system, Invitrogen) and the bovine *LRP8* antisense primer (5'-TCTGGGTCCTCGCACTCATCG-3'). PCRs were performed with Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech), using 35 cycles (first reaction) or 30 cycles (second reaction) of 95 °C for 1 min, 65 °C for 30 sec, and 68 °C for 1 min. The largest 5'-RACE product was isolated, subcloned into pDrive (Qiagen) and sequenced as described above. The sequence obtained contained only part of the missing 5'-end of the cDNA.

Finally, a bovine genomic library (BD Biosciences Clontech) was screened by a phage plaque hybridization procedure following the manufacturer's protocol with a 1 kb *LRP8* cDNA fragment that was labeled with [α -³²P]-dCTP (NEN Life Sciences, Boston, MA) using the random priming method (T7 Quickprime; Amersham Biosciences, Pointe-Claire, QC). From the 6×10^5 phage plaques screened, one positive clone was purified through subsequent rounds of screenings. Recombinant DNA lambda phages were produced and purified [21], then DNA inserts were characterized by *Sac* I restriction digestion and DNA fragments subcloned into pDrive vector (Qiagen). The nucleotide sequence of the clone was determined using specific oligonucleotide primers and shown to contain the complete 5'-end of bovine *LRP8* open reading frame (ORF) as well as the 5'-untranslated region (UTR).

Semiquantitative RT-PCR and Southern blot analyses

Expression pattern of specific genes was studied by semiquantitative RT-PCR in GC and/or TC preparations collected from follicles at different stages of development and CL. Total RNA (1 µg) from GC, TC or CL was reverse-transcribed with an oligo-dT30 primer and PowerScript (BD Biosciences Clontech) to generate the first strand cDNA, using the SMART PCR cDNA synthesis kit [6]. Second cDNA strands were produced with the SMART II 5'-anchored oligo, and PCR-amplified for 18 cycles using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech). To perform semiquantitative RT-PCR, 1 µl of SMART cDNA pools were used in a 25 µl PCR reaction using the Advantage 2 DNA polymerase kit (BD Biosciences Clontech). Gene-specific PCR primers were designed in the open reading frame of bovine cDNA sequences for: *LRP8* mRNA variant containing a proline-rich cytoplasmic insert A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ (sense: 5'-CAGCTTTGATCACCCACTGTGGG-3'; anti-sense: 5'-GACTCAAGGACAGAAACCCTTCC-3'; GenBank: AY364441), *LDLR* (sense: 5'-TTGCCAGCCAAGCGGACACGG-3'; anti-sense: 5'-TTGCTGCCTTTGAGTGACTGGC-3'; GenBank: XM_580492), *VLDLR* (sense: 5'-GTGACCACAGCAGTGTCGGAGG-3'; anti-sense: 5'-GCTGCTGGCTTGGTTACCATTC-3'; GenBank: NM_174489), *RELN* (sense: 5'-GTGGGCAGTTGACGACATCATC-3'; anti-sense: 5'-GATTGGCACACCCAATGTTAAGC-3'; GenBank: AY568568), *MAPK8IP1* (sense: 5'-TACGACTCGGTCAAGTATACGCTG-3'; anti-sense: 5'-AGCTCGAGCTCGTCTTCATGTCG-3'; GenBank: XM_603140), *MAPK8IP2* (sense: 5'-CTGCTCAGATGAGGACGACGAC-3'; anti-sense: 5'-TCCTCCTCAGCCTCCACTAGCAC-3'; GenBank: XM_871210), *DAB1* (sense: 5'-CTTCAGCATCATCATGCTGTTCACG-3'; anti-sense: 5'-GTAGAGAACCACACACGTCTGCAC-3'; GenBank: BC067445), and glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase (*GAPD*; sense: 5'-TGTTCCAGTATGATTCCACCCACG-3'; anti-sense: 5'-CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAACC-3') [6]. For *LRP8*, *LDLR*, *VLDLR*, *RELN*, *MAPK8IP1*, *MAPK8IP2*, *DAB1* and *GAPD*, PCR conditions were as follows: an enzyme activation step at 95 °C for 1 min, followed by a gene specific optimized number of PCR cycles corresponding to: 95 °C for 30 sec, 64 °C for 45 sec, and 68 °C for 90 sec. The number of PCR cycles used was 23, 27, 27, 37, 38, 40, 40 and 18 cycles for *LRP8*, *LDLR*, *VLDLR*, *RELN*, *MAPK8IP1*, *MAPK8IP2*, *DAB1* and *GAPD*, respectively. The PCR reactions were resolved on a 2% Tris-acetate-EDTA-agarose gel (40 mM Tris acetate pH 8, 1 mM EDTA) with ethidium bromide (0.5 µg/ml). PCR products were visualized by UV and the images were digitized. The digitized signals for each gene obtained by semiquantitative RT-PCR were analyzed by densitometry using ImageQuant software version 1.1 (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

The OneStep RT-PCR system (Qiagen) was used for semiquantitative RT-PCR/Southern blotting technique analysis [20] of *LRP8* and *GAPD* (control gene) mRNA levels in bovine tissues. Total RNA was isolated from various tissues collected at a slaughterhouse as described [21], and gonadotropin stimulated GC were collected on day 3 preceeding PGF_{2α} of a four days gonadotropin ovarian stimulation treatment [23]. Reactions were performed as directed by the manufacturer using primers specific for bovine *LRP8* (sense: 5'-TAAGCCTTGAAGATGATGGACTGC-3'; antisense: 5'-ATGCACACAGAGACCACATCATGG-3'; GenBank: AY364441) and *GAPD* as described above. Each reaction was performed using 100 ng of total RNA, and cycling conditions were one cycle of 50 °C for 30 min and 95 °C for 15 min, followed by a variable number of PCR cycles of

95 °C for 1 min, 64 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. The number of cycles used was optimized for each gene to fall within the linear range of PCR amplification with 22 and 21 cycles for *LRP8* and *GAPD*, respectively. Following PCR amplification, samples were electrophoresed on 2% Tris-acetate-EDTA-agarose gels, transferred to nylon membranes and hybridized with corresponding radiolabeled *LRP8* and *GAPD* cDNA fragments, as previously described [21]. Membranes were exposed to a phosphor screen, and signals were quantified on a Storm imaging system using the ImageQuant software version 1.1 (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

Alternative splicing analyses of bovine LRP8 mRNA

The OneStep RT-PCR system (Qiagen) was used to analyse the presence of alternative splicing variants of *LRP8* in GC of bovine DF obtained at day 5 of the estrous cycle. Reactions were performed as directed by the manufacturer. To amplify regions of interest, pairs of specific primers of bovine *LRP8* were used that corresponded to the extracellular segment of human *LRP8* from exon 1 to exon 7 (exon 1, sense: 5'-GATCCACTGCACGGCGGCAAG-3'; exon 2, sense: 5'-GATAACAGTGACGAGGACGACTGC-3'; exon 3, sense: 5'-ATGGCGAGGAGGACTGTCCAGAC-3'; exon 7, anti-sense: 5'-CTGAACGAGTGTCTGCACAACAATG-3'), the *LRP8* O-linked sugar domain (sense: 5'-TGACATGAAGAGGTGCTACCG-3'; anti-sense: 5'-TGGGTAGACATGGCCAATCTGAGC-3'), and the *LRP8* cytoplasmic segment (sense: 5'-ATGGGAATGAAGATGGAAAGATGGG-3'; anti-sense: 5'-GACTCAAGGACAGAAACCCTTCC-3'; GenBank AY364441). Each reaction was performed using 100 ng of total RNA from GC of DF, and conditions were one cycle of 48 °C for 45 min and 94 °C for 2 min, followed by a variable number of PCR cycles of 94 °C for 30

sec, 64 °C for 1 min, and 68 °C for 2 min. The PCR products were size-resolved by electrophoresis on a 1.5% Tris-acetate-EDTA-agarose gel and visualized under UV light using ethidium bromide.

Cell extracts and immunoblot analysis

Total protein extracts from bovine GC or CL were homogenized in M-PER buffer (Pierce, Rockford, IL) that was supplemented with a mix of protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science, Laval, QC) as recommended by the manufacturer. Complete lysis of GC was achieved with multiple passages through a 25-gauge needle attached to a 3-ml syringe. CL were homogenized at 7,000 rpm with a polytron PT1300D (Kinematica AG, Littau-Lucerne, SW). The protein extracts were centrifuged at 16,000 x g for 15 min at 4 C°, and the recovered supernatant (whole cell extract) was stored at -80 °C until electrophoretic analyses were performed. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad Protein assay; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Protein extracts (50 µg protein/sample) were heat-treated (5 min, 100 °C), size-fractionated via a one-dimensional 5 to 20% gradient SDS-PAGE (Invitrogen), and electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Hybond-P, Amersham Biosciences). Immunoblots were performed as described [24]. Membranes were incubated with a rabbit polyclonal antibody raised against the complete intracellular domain of mouse LRP8 (1:5000) [25]. The expression of α -glutathione S-transferase-1 (GSTA1) was used as control and membranes were incubated with a rabbit polyclonal antibody against bovine GSTA1 as described [26]. Immunoreactive proteins were visualized by incubation with an alkaline phosphatase-linked goat anti-rabbit secondary antibody (1:15,000; Sigma-Aldrich Oakville, ON) using NBT/BCIP as alkaline phosphatase substrate (Roche Applied Science).

Images were digitized using a ScanMaker 9800XL flatbed scanner (Microtek lab, Inc., Redondo Beach, CA).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed on PBS-buffered formalin-fixed tissues as described [24]. Paraffin-embedded tissues were cut to 3 μm thickness, mounted on SuperfrostPlus slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), deparaffinized and then rehydrated. Antigenicity lost during the fixation process was retrieved by heat treatment in a pressure cooker for 14 min as described [24]. Non-specific binding sites were saturated by a 30 min incubation period in Tris-buffered saline blocking solution: TBS (100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl), 1% bovine serum albumin and 1% skim milk. Tissue sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal antibody against mouse LRP8 [25] diluted to 1:300 in TBS including 1% normal cow serum. Negative control tissue sections were incubated similarly with or without normal rabbit serum. After three 5 min washes in TBS, primary antibody-LRP8 complexes were detected by incubation for 2 h at room temperature with a monoclonal anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma Chemicals Co.) diluted to 1:200 in TBS blocking buffer. Tissue sections were washed three times in TBS, and incubated with the NBT/BCIP alkaline phosphatase substrate (Roche Applied Science). Sections were mounted in 5% gelatin, 27% glycerol, and 0.1% sodium azide. Photographs were taken under bright field illumination using a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a digital camera (Nikon DXM 1200). Digital images were processed by Photoshop software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) and assembled by Illustrator software (Adobe Systems Inc.).

Statistical analysis

Gene-specific (*LRP8*, *LDLR*, *VLDLR*, *RELN*, *MAPK8IP1*, *MAPK8IP2*, *DABI*) signals were normalized with corresponding *GAPD* signals for each sample. Homogeneity of variance between follicular group and CL was verified by O'Brien and Brown-Forsythe tests. Corrected values of gene-specific mRNA levels were compared between follicular and CL groups by one-way ANOVA. When ANOVA indicated significant differences ($P < 0.05$), multiple comparisons of individual means for SF, DF, OF and CL groups were compared by the Tukey-Kramer test ($P < 0.05$). Dunnett's test ($P < 0.05$) was used to compare individual means for the temporal hCG-induced follicular wall samples. Statistical analyses were performed using JMP software (SAS Institute, Inc., Carry, NC). Data were presented as means \pm SEM.

Results

Cloning and characterization of bovine LRP8 cDNA

Three strategies were used to clone the bovine LRP8 cDNA. First, a bovine *LRP8* cDNA fragment (500 bp) generated from a previous mRNA gene profiling experiment [6] was used as a probe to screen, by hybridization, a size-selected cDNA library of 3.5 to 4.5 kb generated from bovine GC that were collected from DF at day 5 of the estrous cycle. Sequencing results showed that the longest cDNA fragment isolated did not contain the full-length open reading frame (ORF), and started at G¹⁶³ (Fig. 1). The 5'-RACE method was used as an alternate cloning approach and yielded only part of the missing 5'-end of the *LRP8* cDNA despite numerous attempts. A third cloning approach consisted of screening a bovine genomic library with the most upstream 5'-cDNA fragment of the bovine *LRP8* cDNA. Positive hybridizing clones were isolated and shown to contain the complete 5'-end of bovine *LRP8* ORF as well as the 5'-flanking DNA. Collectively, these results revealed that bovine *LRP8* cDNA cloned from GC consists of 4535 bp, and the nucleotide sequence was submitted to Genbank (accession number: AY364441). It was shown to be composed of a 5'-UTR of 552 bp, an ORF of 2490 bp (including the stop codon), and a 3'-UTR of 1493 bp containing seven copies of an AU-rich element (ATTTA), a motif known to contribute to short-lived mRNA [27], as well as a poly-adenylation signal (AATAAA) followed by a poly(A)⁺ tail. The nucleic acid sequence in the vicinity of the start codon (300 to 600 bp; AY364441) is particularly rich in guanosine and cytosine (84%). The latter is known to promote formation of strong secondary structures in mRNA that impede the efficiency of reverse transcriptase activity to generate full-length cDNA from mRNA, and contribute to resist DNA strand dissociation during the PCR reaction used in 5'-RACE cDNA cloning procedures.

The ORF of the bovine *LRP8* cDNA codes for an 829-amino acid protein, with a theoretical molecular mass (M_r) of 91,500 and isoelectric point (pI) of 4.9 (Fig. 1). Amino acid homology search in GenBank by PsiBlast revealed orthologous proteins with an overall identity of 87% and 85% for human (NM_033300) and mouse (AJ312058) proteins, respectively. The characterized bovine LRP8 protein is 36 amino acids longer than the human LRP8 variant 2 (NM_033300) [13] and 41 amino acids shorter than the mouse (AJ312058) [28] protein (Fig. 1). The bovine LRP8 protein is structurally composed of a long extracellular amino-terminal ligand binding segment (M¹ to A⁶⁹¹), a single transmembrane segment (A⁶⁹² to W⁷¹⁴) and an intracellular segment (R⁷¹⁵ to P⁸²⁹). The extracellular ligand binding segment contains a signal peptide (M¹ to A²⁷) that should be cleaved after A²⁷, and conserved domains such as four copies of a cysteine-rich LDL receptor A domain repeat (LDLR-A; K⁴⁰-C⁷⁶; K⁷⁹-C¹¹⁷; Q¹²⁰-C¹⁵⁸; G¹⁶³-C¹⁹⁹), an EGF-like domain (C²⁰⁶-C²⁴⁰), an EGF-calcium domain (D²⁴²-C²⁸⁰), five copies of a LDL receptor B domain repeat (LDLR-B; N³²⁸-V³⁷³; K³⁷⁵-L⁴¹⁶; G⁴¹⁸-L⁴⁶⁰; Q⁴⁶²-D⁵⁰⁵; K⁵⁰⁶-E⁵⁴⁶), an O-linked sugar domain (A⁶⁰³-Y⁶⁷⁸), and four potential N-glycosylation sites (N³⁸⁴, N⁴⁰⁴, N⁶³⁸, N⁶³⁷) (Fig. 1). The cytoplasmic segment contains the consensus tetrapeptide ⁷²⁹NPVY⁷³² sequence as internalization signal [13,29], a 59-amino acid (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷) insert [14], and two potential consensus cAMP/cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (T⁷²², T⁷³⁶).

Tissue distribution of bovine LRP8 mRNA and splicing variants in granulosa cells

The expression of bovine *LRP8* mRNA in various bovine tissues was compared by RT-PCR/Southern blot analysis. Results revealed high levels of *LRP8* mRNA in GC from DF collected at day 5 of the estrous cycle and in GC from follicles collected on the third day

following initiation of an ovarian stimulation treatment. Conversely, expression was not detected in the other tissues analyzed (Fig. 2).

The expression of *LRP8* mRNA variants was studied in GC of DF at day 5 of the estrous cycle since *LRP8* transcript variants have been reported in human, mouse and chicken tissues. A bovine *LRP8* cDNA lacking the putative O-linked sugar domain was first cloned from screening the bovine GC size-selected cDNA library. Thus, we investigated the possible expression of a bovine *LRP8* variant containing that domain by RT-PCR using total RNA extracted from GC, and oligonucleotide primers flanking the putative O-linked sugar domain (A⁶⁰³-Y⁶⁷⁸; Fig.1). The RT-PCR results generated major (487 bp) and minor (259 bp) cDNA products (Fig. 3A; lane 1). The PCR products were purified and characterized by sequencing, and corresponded to transcript variants that contained, or lacked, the putative O-linked sugar domain. These results indicate that the major form of the LRP8 receptor expressed in GC contains the putative O-linked sugar domain.

The most notable difference between *LRP8* and other closely related members of the LDL-receptor gene family is the presence of a 59-amino acid (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷; Fig.1) residue insert in the cytoplasmic tail that is encoded by an additional exon. Since we first isolated a bovine cDNA that lacks this insert, we wished to determine whether a bovine variant containing this sequence is expressed in GC of DF. Using primers flanking the relevant region, RT-PCR analysis generated two cDNA products of 555 bp and 378 bp that are represented at a similar level of expression (Fig. 3A, lane 2), and corresponded to transcript variants containing, or missing, the 59-amino acid stretch.

Since the full-length human LRP8 receptor is composed of a long extracellular domain encoded by 16 exons [14], we investigated the possible expression of LRP8 receptor transcript lacking exons within the extracellular domain. RT-PCR analyses were carried out using GC total RNA, and primers anchored in either the first, second or third exon encoding the extracellular amino-terminal of the receptor combined with a second primer anchored in exon 7. The RT-PCR results generated a cDNA product for each pair of primers (Fig. 3B) of 523 bp, 404 bp or 307 bp. Their characterization by sequencing revealed that they all lack exon 5 encoding for 129 amino acids that should be located between S¹⁶¹ and L¹⁶² of the bovine sequence when compared to the human LRP8 variant 1 protein (D50678) [14].

Regulation of LRP8, LDLR and VLDLR mRNAs in granulosa cells

The expression of the *LRP8* A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ mRNA variant harbouring the 59 amino acid cytoplasmic insert was analyzed by semiquantitative RT-PCR in GC samples collected from follicles obtained at different developmental stages including: small follicles (SF; 2-4 mm), dominant follicles (DF) at day 5 of the estrous cycle, ovulatory follicles (OF) 24 h following injection of an ovulatory dose of hCG, and corpus luteum (CL) at day 5. The semiquantitative RT-PCR results demonstrated highest expression in GC of DF compared to other follicles and CL ($P < 0.0001$) (Fig. 4). Expression of *LRP8* mRNA was 3.4 fold higher in DF compared to SF samples. Since LRP8 shares high levels of homology with the LDLR and the VLDLR, and that the expression of these receptors have not been described in bovine GC during follicular development in a synchronized estrous cycle and CL, the expression of their mRNAs were compared by semiquantitative RT-PCR. Results show that while *LDLR* and *VLDLR* mRNAs

were expressed in all GC extracts and CL, no significant variations in their respective mRNA levels were observed (Fig 4).

Since hCG treatment caused a downregulation of *LRP8* mRNA in GC 24 h after its injection, semiquantitative RT-PCR was used to study the expression of *LRP8* A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ mRNA variant in follicular walls obtained from ovulatory follicles that were isolated at different time points between 0 and 24 h after hCG treatment (Fig 5). Levels of *LRP8* mRNA were elevated prior to hCG treatment, but decreased by 3.2-fold 12 h after hCG injection, and reached almost undetectable levels after 24 h ($P < 0.0001$).

Regulation and localization of LRP8 protein in ovarian follicles

To determine whether the increase in *LRP8* mRNA in bovine DF was associated with changes in protein levels, a specific antibody raised against the entire intracellular segment of mouse LRP8 was used in immunoblot analyses of GC protein extracts isolated from follicles at different developmental stages. The results showed the presence of three immunoreactive signals in all GC extracts studied: a 145×10^3 M_r band believed to correspond to the full-length protein, as well as a double protein band between 95 and 105×10^3 M_r thought to represent splicing variants and/or the non-glycosylated precursor of LRP8 (Fig. 6). A significant increase in all LRP8 protein isoforms was observed in GC extracts of day 5 DF compared to SF ($P < 0.05$), mirroring what was observed for LRP8 mRNA. Furthermore, LRP8 signals decreased significantly with time in GC extracts that reached the lowest level 24 h after hCG injection ($P < 0.05$), in agreement with mRNA analyses. Conversely, LRP8 protein was not detected in CL (Fig. 6).

To determine the cellular localization of LRP8 protein expression in bovine ovary, immunohistochemistry was performed using the same antibody as employed for immunoblotting to probe sections of follicles obtained at different developmental stages, as well as CL. Intense staining for LRP8 proteins was detected in the GC layer of DF whereas the theca layer and stromal tissue were not immunolabeled (Fig. 7 A,B). Immunostaining was mainly located at the cytoplasmic membrane of GC. (Fig. 7 B). A marked decrease in LRP8 immunoreactivity was observed in the GC layer of OF isolated 24 h after hCG treatment (Fig. 7 C,D). Preantral follicles at different developmental stages were negative whereas small antral follicles (2-4 mm) showed faint to absent immunostaining (Fig. 7 E). No labeling was observed in follicles in late atresia (not shown) and in luteal cells (Fig. 7 F).

Expression of RELN, MAPK8IP1, MAPK8IP2 and DAB1 mRNAs in periovulatory follicles

In nervous tissues, RELN is the natural ligand for LRP8 whereas MAPK8IP1, MAPK8IP2 and DAB1 were shown to interact with the intracellular segment of LRP8 following RELN binding [18]. Since LRP8 was shown to be differentially expressed in GC of bovine DF, we wished to determine by semiquantitative RT-PCR if *RELN*, *MAPK8IP1*, *MAPK8IP2* and *DAB1* mRNAs were co-expressed in dominant follicles. The results demonstrate that *RELN* is expressed at highest levels in theca cells (TC) preparation of DF, decreased significantly in TC of OF ($P < 0.0037$; Fig 8), and is absent in GC and CL (data not shown). *MAPK8IP1* mRNA was shown to be expressed in GC of DF and increased in OF ($P < 0.037$; Fig 8). Conversely, *MAPK8IP2* and *DAB1* were not detected in GC (data not shown).

Discussion

This study is the first to document the cloning and characterization of full-length bovine *LRP8* cDNA, and to demonstrate the expression of several isoforms of *LRP8* in GC of bovine DF using an *in vivo* model. Furthermore, our data report the differential expression of *RELN* mRNA, a LRP8 ligand, in thecal layer of DF whereas *MAPK8IP1* mRNA, a LRP8 scaffolding protein involved in intracellular LRP8 signaling, is expressed in GC. These observations suggest the existence of a new interaction mechanism between thecal and granulosa layers through RELN and LRP8/MAPK8IP1 signaling in the dominant follicle.

Our comparative analysis reveals that the amino acid sequence of full-length bovine LRP8 protein is similar to that of human and mouse, and that all known structural and functional domains are conserved. Several splicing variants in the extracellular segment of LRP8 are expressed in GC of DF, but they all lack ligand binding repeats 4-6 encoded by exon 5 when compared to the human gene [14]. Differentially spliced receptors with either three, four or five repeats are also expressed in human, mouse and chicken [14,15,28,29]. Human LRP8 splice variants harboring three or seven repeats have identical affinity for β -VLDL [14,30]. Therefore, the functional significance of the different splice variants in the extracellular segment of LRP8 is still unknown. LRP8 can also be differentially spliced in the cytoplasmic segment, so that a longer version contains a unique 59-amino acid proline-rich insert (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷) encoded by exon 18 as characterized in man and mouse [15]. Herein, we demonstrate that a bovine variant harboring this insert is expressed in GC of DF at a level similar to the short isoform, and its amino acid composition is well conserved with its mammalian orthologs.

Previous studies reported highest expression of *LRP8* mRNA in bovine GC of DF compared to small follicles (2-4 mm), and at the time of DF selection, *LRP8* mRNA was most abundant in the future DF compared to the largest subordinate follicle [6,8]. Our RT-PCR and immunoblotting results reveal that *LRP8* mRNA and proteins are specifically expressed in GC with almost exclusive expression in the DF, with faint to undetectable labeling in small antral follicles (2-4 mm), and no expression in preantral or atretic follicles. However, no protein expression was detected in GC of small antral follicles by immunohistochemistry. This discrepancy may be explained by the pooling of GC from 20 small follicles (2-4 mm) per group at different stages of development, obtained from ovaries at various stages of the estrous cycle, for RT-PCR and immunoblotting studies, whereas individual 2-4 mm follicles were observed in immunohistochemistry. The pooling of GC from small follicles was necessary to allow sufficient amount of mRNA and protein for the analyses. A previous study using RT-PCR analysis, reported that *LRP8* mRNA was expressed in bovine TC [31]. However, in the latter study, the preparations of TC were not evaluated for possible contamination with GC, and the reverse primer used in their RT-PCR to evaluate *LRP8* expression does not match the described bovine *LRP8* sequence (AY364441). It is well known that TC are imbedded in ovarian connective tissues and often contaminated by GC [32,33]. The TC preparations used in the present study were analyzed by RT-PCR for the presence of *CYP19A1* mRNA, a specific GC marker, and results showed that TC samples collected from DF were slightly contaminated by GC (data not shown). Conversely, our GC preparations were not contaminated by TC as confirmed by the absence of cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 (*CYP17A1*) mRNA expression (data not shown). We conclude that *LRP8* is not expressed in bovine TC based on immunohistochemical results reported herein.

The pattern of LRP8 expression correlates with the capacity of follicles to synthesize high levels of steroids. In fact, during the recruitment phase of follicular development, *CYP19A1* mRNA levels increase in follicles [34]. After selection, the DF expresses higher levels of mRNAs for *LHCGR*, and enzymes required for progesterin and androgen synthesis such as hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase (*HSD3B2*), cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (*CYP11A1*), steroidogenic acute regulator (*StAR*) and *CYP17A1*, than do unrecruited follicles [6,7,34]. Moreover, concentrations of apolipoproteins such as LDL and VLDL increase in follicular fluid of medium and large-sized antral follicles (4-10 mm) compared to small antral follicles (2-4 mm) [35]. Collectively, these reported observations and our present data suggest that LRP8 may contribute to cholesterol uptake in GC during follicular growth and dominance, when cholesterol requirement for steroidogenic activity is increased.

Cholesterol transport protein apolipoprotein E (APOE), which associates with cholesterol-rich lipoproteins such as LDL and VLDL, and enables binding to members of the LDL-receptor family, is expressed in the theca/interstitial cells (TIC) of rodents [36]. Also, APOE interacts with unknown members of the LDL-receptor family to increase transcription of the enzyme *CYP17A1* and stimulate TIC androgen production [37]. We demonstrate that LRP8 is not present in bovine TC known to express *CYP17A1*, which excludes LRP8 as the LDL-receptor involved in the regulation of androgen synthesis by *CYP17A1* in the bovine ovary. Our data further suggest that LRP8 may have functions other than cholesterol uptake during follicular growth since *LRP8* mRNA and protein are downregulated during the ovulatory process, and are absent in CL. Downregulation or absence of LRP8 contrasts markedly with increased cholesterol

requirements during ovulation and luteinization [38,39]. In contrast to LRP8, we show that LDLR and VLDLR, already known to mediate cholesterol uptake in the ovary [31,35,40], are expressed in bovine GC of OF 24 h post-hCG and in CL.

Besides its role as a classical endocytotic receptor, LRP8 regulates multiple intracellular signaling cascades. LRP8 and VLDLR are components of a signaling pathway that relays the RELN signal into neurons for proper neuronal positioning during brain development, and for learning and memory in the adult brain [16-18,41]. RELN interacts with the extracellular domains of LRP8 and VLDLR, causes receptor clustering [42], and triggers activation of intracellular signaling pathways [43]. One intracellular interacting partner of LRP8 and VLDLR is DAB1. Upon binding of RELN to LRP8 or VLDLR, DAB1 is phosphorylated and activates pathways controlling cell motility, adhesion and shape [43-47]. In the mouse ovary, *RELN* mRNA is expressed in the interstitial region but not in follicles [48]. Our data show that bovine *RELN* mRNA is mostly expressed in TC preparations of DF, downregulated in TC preparations of OF 24 h post-hCG, and absent in GC and luteal cells. Therefore, *RELN* mRNA in theca layer and *LRP8* mRNA and protein in GC are predominantly expressed in the DF, and are similarly downregulated during the ovulatory process and luteinization. Additionally, we performed an RT-PCR analysis on GC of DF to determine if *DAB1* mRNA is expressed in the DF. Levels were low to undetectable, and further studies are needed in order to confirm if DAB1 protein is present in the follicle and eventually if it participates in mediating LRP8 and/or VLDLR signaling in GC.

Intracellular proteins that interact specifically with the 59-amino acid insert (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷) of LRP8 include MAPK8IP1 and MAPK8IP2 [12]. Our data demonstrate that *MAPK8IP1* and *LRP8* mRNAs are expressed in GC of the DF, which suggest that these proteins may also interact in GC. MAPK8IP1 was shown to scaffold different proteins regulating the c-Jun N-terminal kinase (JNK, MAPK8) [11,12] and AKT1 [49] signaling pathways. Inhibition of JNK [50] or activation of AKT1 [49] by MAPK8IP1 reduces apoptosis. MAPK8IP1 also interacts with RhoGEF, and exchange factor for the small GTPase rhoA, involved in the rearrangement of the actin cytoskeleton [51]. We can hypothesize that MAPK8IP1 participates in preventing apoptosis or modulates cellular activity by acting on cytoskeletal components in GC of the DF. We also reported that *MAPK8IP1* mRNA expression increases in GC of hCG-induced OF at a time when *LRP8* expression is downregulated. It is possible that MAPK8IP1 regulates JNK activation to prevent apoptosis during cellular stress induced by ovulation in a pathway not involving LRP8 [52]. Additionally, in the hCG-induced OF, MAPK8IP1 may interact with JNK which was proposed to activate RHOX5, a transcription factor known to switch on many GC ovulatory-specific genes [53].

In summary, we report the molecular characterization of bovine LRP8 and its specific expression in GC as a new marker of follicular dominance. Components of LRP8 signaling cascade, including LRP8 ligand RELN and intracellular interacting protein MAPK8IP1 are also expressed in the DF. These findings reveal the existence of a possible RELN/LRP8/MAPK8IP1 interaction in the developing DF.

Acknowledgments

This work was supported by a Discovery Grant (to J.G.L.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and a fellowship (to T.F.) from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). This work was presented in part at the 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Quebec, 2005. The authors thank Manon Salvas for technical assistance during nucleic acid sequencing, and Dr. Christine Theoret (Université de Montréal) for constructive comments on the manuscript. The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to GenBank with accession number AY364441.

References

- 1- Lussier JG, Matton P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, Carruthers TD. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemiovariectomized heifers. *J Reprod Fertil* 1994; 102:95-105.
- 2- Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001; 65:648-654.
- 3- Beg MA, Ginther OJ. Follicle selection in cattle and horse: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 2006; 132:365-377.
- 4- Mihm M, Austin EJ. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrin* 2002; 23:155-166.
- 5- Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrin* 2002; 23:139-154.
- 6- Fayad T, Lévesque V, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* 2004; 70:523-533.
- 7- Ndiaye K, Fayad T, Silversides DW, Sirois J, Lussier JG. Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 2005; 73:324-333.
- 8- Sisco B, Hagemann LJ, Shelling AN, Pfeffer PL. Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology* 2003; 144:3904-3913.
- 9- Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999; 1:E157-162.

- 10- Strickland DK, Gonas SL, Argraves WS. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrin Met* 2002; 13:66-74.
- 11- Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19:7245-7254.
- 12- Stockinger W, Brandes C, Fasching D, Hermann M, Gotthardt M, Herz J, Schneider WJ, Nimpf J. The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J Biol Chem* 2000; 275:25625-25632.
- 13- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T. Human Apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 1996; 271:8373-8380.
- 14- Kim DH, Magoori K, Inoue TR, Mao CC, Kim HJ, Suzuki H, Fujita T, Endo Y, Saeki S, Yamamoto TT. Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J Biol Chem* 1997; 272:8498-8504.
- 15- Brandes C, Novak S, Stockinger W, Herz J, Schneider WJ, Nimpf J. Avian and murine LR8B and human apolipoprotein E receptor 2: differentially spliced products from corresponding genes. *Genomics* 1997; 42:185-191.
- 16- Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 2005; 47:567-579.

- 17- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J. Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1998; 273:33556-33560.
- 18- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 1999; 97:689-701.
- 19- Andersen OM, Yeung CH, Vorum H, Wellner M, Andreassen TK, Erdmann B, Mueller EC, Herz J, Otto A, Cooper TG, Willnow TE. Essential role of the apolipoprotein E receptor-2 in sperm development. *J Biol Chem* 2003; 278:23989-23995.
- 20- Filion F, Bouchard N, Goff AK, Lussier JG, Sirois J. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J Biol Chem* 2001; 276:34323-34330.
- 21- Bédard J, Brûlé S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG. Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 2003; 64:152-165.
- 22- Lévesque V, Fayad T, Ndiaye K, Nahé Diouf M, Lussier JG. Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* 2003; 35:72-78.
- 23- Lussier JG, Carruthers TD. Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bovine follicular fluid. *Theriogenology* 1989; 31:779-793.
- 24- Brûlé S, Faure R, Doré M, Silversides DW, Lussier JG. Immunolocalization of vacuolar system-associated protein-60 (VASAP-60). *Histochem Cell Biol* 2003; 119:371-381.

- 25- Stockinger W, Hengstschlager-Ottner E, Novak S, Matus A, Huttinger M, Bauer J, Lassmann H, Schneider WJ, Nimpf J. The low density lipoprotein receptor gene family. Differential expression of two alpha2-macroglobulin receptors in the brain. *J Biol Chem* 1998; 273:32213-32221.
- 26- Diouf MN, Sayasith K, Lefebvre R, Silversides DW, Sirois J, Lussier JG. Expression of phospholipase A2 group IVA (PLA2G4A) is upregulated by human chorionic gonadotropin in bovine granulosa cells of ovulatory follicles. *Biol Reprod* 2006; 74:1096-1103.
- 27- Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986; 46:659-667.
- 28- Brandes C, Kahr L, Stockinger W, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J. Alternative splicing in the ligand binding domain of mouse ApoE receptor-2 produces receptor variants binding reelin but not alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 2001; 276:22160-22169.
- 29- Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J. A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J Biol Chem* 1996; 271:11732-11736.
- 30- Sun XM, Soutar AK. Expression in vitro of alternatively spliced variants of the messenger RNA for human apolipoprotein E receptor-2 identified in human tissues by ribonuclease protection assays. *Euro J Biochem* 1999; 262:230-239.
- 31- Argov N, Sklan D. Expression of mRNA of lipoprotein receptor related protein 8, low density lipoprotein receptor, and very low density lipoprotein receptor in bovine ovarian cells during follicular development and corpus luteum formation and regression. *Mol Reprod Dev* 2004; 68:169-175.

- 32- Bogovich K, Scales LM, Higginbottom E, Ewing LL, Richards JS. Short term androgen production by rat ovarian follicles and long term steroidogenesis by thecal explants in culture. *Endocrinology* 1986; 118:1379-1386.
- 33- Magoffin DA, Erickson GF. Primary culture of differentiating ovarian androgen producing cells in defined medium. *J Biol Chem* 1982; 257:4507-4513.
- 34- Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 1998; 76:1903-1921.
- 35- Argov N, Moallem U, Sklan D. Lipid transport in the developing bovine follicle: messenger RNA expression increases for selective uptake receptors and decreases for endocytosis receptors. *Biol Reprod* 2004; 71:479-485.
- 36- Nicosia M, Moger WH, Dyer CA, Prack MM, Williams DL. Apolipoprotein-E messenger RNA in rat ovary is expressed in theca and interstitial cells and presumptive macrophage, but not in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 1992; 6:978-988.
- 37- Zerbinatti CV, Dyer CA. Apolipoprotein E peptide stimulation of rat ovarian theca cell androgen synthesis is mediated by members of the low density lipoprotein receptor superfamily. *Biol Reprod* 1999; 61:665-672.
- 38- Niswender GD. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 2002; 123:333-339.
- 39- Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, Gonzalez RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186:137-141.

- 40- Grummer RR, Carroll DJ. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J Anim Sci* 1988; 66:3160-3173.
- 41- Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J. Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem* 2002; 277:49958-49964.
- 42-Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock HH, Hiesberger T, Herz J, Weeber EJ, Sweatt JD, Pramatarova A, Howell B, Schneider WJ, Nimpf J. Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol Cell Biol* 2004; 24:1378-1386.
- 43- May P, Herz J, Bock HH. Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cellular and Molecular Life Sci* 2005; 62:2325-2338.
- 44- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 1999; 24:481-489.
- 45- Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, Quattrocchi CC, Antalffy BA, Sheldon M, Armstrong DD, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G, Clark GD. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet* 2003; 35:270-276.
- 46- Bock HH, Herz J. Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol* 2003; 13:18-26.
- 47- Arnaud L, Ballif BA, Forster E, Cooper JA. Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr Biol* 2003; 13:9-17.
- 48- Ikeda Y, Terashima T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dynam* 1997; 210:157-172.

- 49- Kim AH, Sasaki T, Chao MV. JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J Biol Chem* 2003; 278:29830-29836.
- 50- Dong Z, Zhou L, Del Villar K, Ghanevati M, Tashjian V, Miller CA. JIP1 regulates neuronal apoptosis in response to stress. *Mol Brain Res* 2005; 134:282-293.
- 51- Meyer D, Liu A, Margolis B. Interaction of c-Jun amino-terminal kinase interacting protein-1 with p190 rhoGEF and its localization in differentiated neurons. *J Biol Chem* 1999; 274:35113-35118.
- 52- Richards JS, Russel DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:69-92.
- 53- MacLean JA 2nd, Rao MK, Doyle KM, Richards JS, Wilkinson MF. Regulation of the Rhox5 gene in primary granulosa cells: preovulatory expression and dependence on SP1/SP3 and GABP. *Biol Reprod* 2005; 73:1126-1134.

Fig. 1. Predicted amino acid sequence of bovine LRP8 and comparison with other mammalian orthologues. The amino acid sequence of bovine (*bov*; AY364441) LRP8 is aligned with the human (*hum*; NM_033300) and mouse (*mou*; AJ31205) orthologues. Identical residues are marked with a *printed period*, *hyphens* indicate gaps in protein sequences created to optimize alignment, and numbers on the *right* refer to the last amino acid on that line. The *arrowhead* indicates the putative cleavage site of the signal peptide. The extracellular segment of LRP8 contains different domains that are *overlined*, such as four LDLR-A domains, an EGF-like domain, an EGF-Ca domain and five LDLR-B domains. Four consensus N-linked glycosylation sites are indicated with an *asterisk*. The *boxed* region indicates the transmembrane segment, and the two consensus threonine phosphorylation sites located in the intracellular segment of LRP8 are indicated by a *dot*.

FIGURE 1

LDLR-A1
 bov MGRPERGALRFLALLLLL----QLQHAAAADPLHGGGQSVKRECDENQPRCRNERCI 55
 hum ..L..P.P..L.....LLLLL.G.....L...PA.D.EKD..Q..... 60
 mouL.....L---G.G..S.....P...P...E.D..... 54

LDLR-A2
 bov PSVWRCEDEDDCSDNSDEDDCPKKTCAUSDFTCNNGHCIRERWKCDGEEDCPDGSDESEA 115
 humL.H.....D.....H.....E..... 120
 mou ..L.....N.....R.....D.....P.....E.....K. 114

LDLR-A3
 bov TCTKQVCPAEKLSGCGPTSHKCVPASWRCDGKDCESGADEAGCATS-LGTCRGDEFQCGD 174
 humG..... 165
 mou ..SSEE.....G.....P..AP.P..EN..... 174

LDLR-A4
 bov GTCVFAIKRCNQEQDCPDGSDGTGLQ----- 201
 hum ----- 165
 mou ...L.....R.....A.....ESTCEGPEGPRRFQCKSGECVDGGKVCDDQRDC 234

EGF-like
 bov -----GLNECLHNNGGCSHICTDLKIGPECTCPAGYQLLDQKTCGGDIDECEDPD 250
 hum -----W.....F.....K. 214
 mou RDWSDEPQKVC.....F.....Q... 294

EGF-Ca
 bov ACSQICVNYRGYFKCECHPGYEMDTLTKNCKAVAGRSPLIFTRHVEVRRIDLVKRDYSR 310
 humY.....L.....A..K.....N... 274
 mouK..... 354

LDLR-B1
 bov LIPMLKNVVALDVEVATNRIYWCDSLRYKLIYSAYMDKASNPFVEQDVLIDEQLHSPPEGLAV 370
 humD.K..E..... 334
 mouH.....I.D..V..... 414

LDLR-B2
 bov DWVHKHIYWTDSGNKTTISVATVDGKRRCTLFSRNLSSEPRAIADVPLQGFMYSDWGFQAK 430
 humG..R.....R.....D... 394
 mouT..R.....E.....R..... 474

LDLR-B3
 bov IEKSGLVNGVGRQTLVSDGIENPNGITLDLLNQLRYWVDSKHLQLSSIDFSGNRMKLIS 490
 humD.....N.....S.....T... 454
 mou ...A...AD..P...N.....S.....N.....F. 534

LDLR-B4
 bov PDFLSHPFGIASFEDKVPWTDLENAIFSANRLNGLEISVLAENLNNPHDIVIFHELKQP 550
 hum T.....V.....I..... 514
 mou T.....V...VQ.....AI.....NE. 594

LDLR-B5
 bov RAADACELSAQPNGGCEYLCLPAPQISSHSKYTCACPDTMWLGPDMKRCYRAPQSTSTT 610
 hum ..P...V..... 574
 mou K...D...D.....F.....K..... 654

LDLR-B6
 bov TLASTTARTLADTTTRAPGTTNHSPTYQNHSTETPSLATEVPSVSVPRAPSPSTPSPA 670
 hum ...MT..VPA.....V.RS.....TAA.....L... 634
 mou ...AMT..VPA.....I.D.A.....QTVA..H..N.....T... 714

TM
 bov *TSNHSQHYGNEDEGKMGSTVTA*AVIGIIVPMVVIALLCMSGYLIV*RNWKRKNKSMNPDNP 730
 humA...S.....I..... 694
 mouGSQ.....V...I..... 774

LDLR-B7
 bov VYRKTTEEEERDELHIGRTAQIGHVYPAAISSFDHPLWAEPCLGETRELEDPAFALKELF 790
 humD.....R.....P..... 754
 mouNY.R.....D..... 834

LDLR-B8
 bov VLPGEPRSQPHQLPKNPLSELVVKCKRVALSLEDDGLP 829
 humL.....S..... 793
 mouL..... 873

Fig. 2. Expression of *LRP8* mRNA in bovine tissues. Total RNA was extracted from various bovine tissues, and samples (100 ng) were analyzed for *LRP8* and *GAPD* (control gene) content by a semiquantitative RT-PCR/Southern blotting analysis as described in *Materials and Methods*. A, Expression of *LRP8* mRNA in bovine tissues (656 bp). B, Expression of *GAPD* mRNA in bovine tissues (710 bp). The granulosa cells (GC) samples represent either a total RNA pool from dominant follicles (DF) that were collected at day 5 of the estrous cycle, or a pool of ≥ 8 mm follicles that were collected on day 3 of a four day gonadotropin ovarian stimulation protocol (SOV).

FIGURE 2

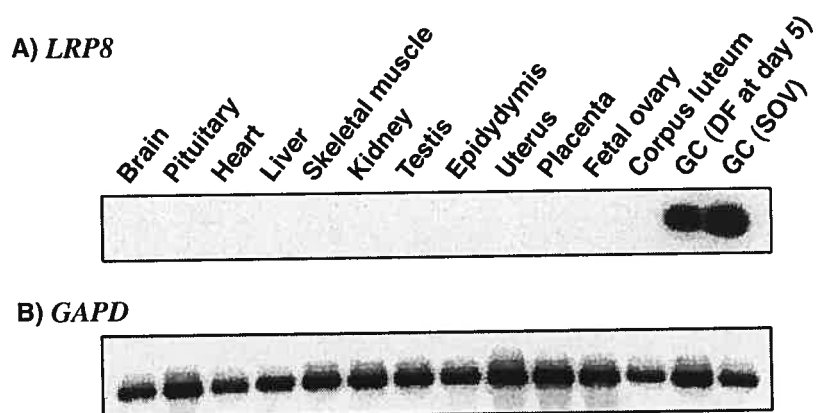


Fig. 3. Expression of alternative mRNA splicing variants of *LRP8* in granulosa cells. Total RNA was extracted from granulosa cells collected from dominant follicle at day 5 of the estrous cycle, then used in mRNA expression analyses using RT-PCR as described in *Materials and Methods*. The PCR products were characterized by sequencing. A, *Lane 1*, RT-PCR analyses using primer pairs spanning the extracellular O-linked sugar domain (A⁶⁰³-Y⁶⁷⁸) resulted in two PCR products corresponding to mRNA containing (487 bp), or lacking (259 bp), the O-linked sugar domain. *Lane 2*, RT-PCR analyses using primer pairs spanning the intracytoplasmic 59-amino acid (A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷) *LRP8* specific domain resulted in two PCR products corresponding to mRNA containing (555 bp), or missing (378 bp), the 59-amino acid stretch. B, *Lane 1*, RT-PCR analyses were carried out using primer pairs anchored in either in the first, the second (*lane 2*) or the third (*lane 3*) exon encoding the extracellular amino-terminal of *LRP8* with a second primer anchored in exon 7, which resulted in PCR products of 523 bp, 404 bp and 307 bp, respectively, that were all lacking exon 5.

FIGURE 3

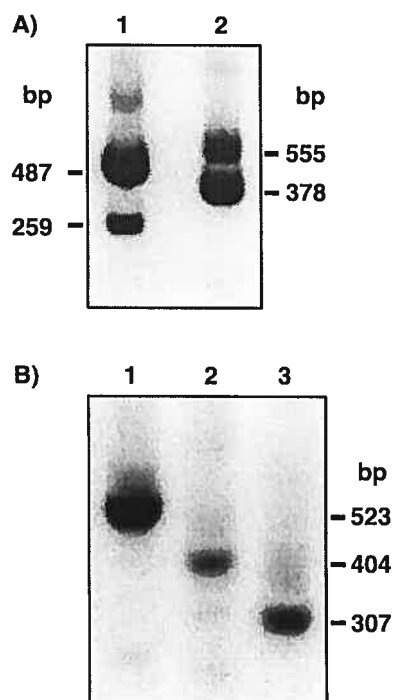


Fig. 4. Analysis of *LRP8*, *LDLR* and *VLDLR* mRNA expression in bovine granulosa cells and CL. Total RNA was extracted from bovine granulosa cells collected from 2-4 mm small follicles (SF), dominant follicles (DF) at day 5 of the estrous cycle, ovulatory follicles (OF) 24 h after injection of hCG and corpora lutea (CL) from day 5 of the estrous cycle, then used in mRNA expression analyses using semiquantitative RT-PCR as described in *Materials and Methods*. A, Expression of *LRP8* A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ mRNA variant (305 bp), *LDLR* (320 bp), *VLDLR* (355 bp) and *GAPD* (710 bp) mRNAs in granulosa cells of bovine follicles and CL. B, Relative changes in *LRP8*, *LDLR* and *VLDLR* mRNA in granulosa cells of bovine follicles and CL. The intensity of *LRP8*, *LDLR*, *VLDLR* signals were normalized with the control gene *GAPD*. Different *letters* denote samples that differed significantly ($P < 0.05$). Data are presented as means \pm SEM, and the number of independent samples (*i.e.* animals per group) is indicated in parenthesis.

FIGURE 4

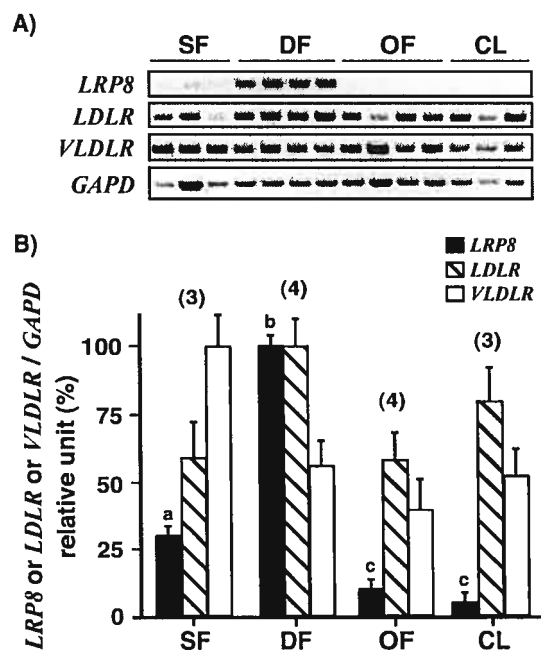


Fig. 5. Regulation of *LRP8* mRNA by hCG in bovine follicles during the periovulatory period. Total RNA was extracted from preparations of bovine follicular wall obtained from ovulatory follicles isolated between 0-24 h after injection of hCG, then used in mRNA expression analyses by semiquantitative RT-PCR as described in *Materials and Methods*. A, Regulation of *LRP8* A⁷⁵⁹-K⁸¹⁷ mRNA (305 bp) in bovine follicles, and constitutive expression of *GAPD* (710 bp) mRNA in the same follicles. B, Relative changes in *LRP8* mRNA in bovine follicles after hCG treatment. The intensity of *LRP8* signals were normalized with the control gene *GAPD*. Bars marked with an *asterisk* are significantly different ($P < 0.05$) from 0 h post-hCG. Data are presented as means \pm SEM, representing two independent animals per time point.

FIGURE 5

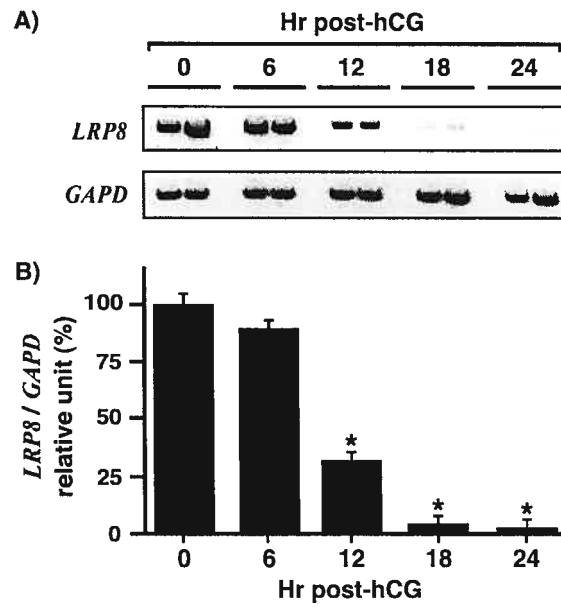


Fig. 6. Regulation of LRP8 protein in bovine granulosa cells and CL. Protein extracts were prepared from granulosa cells obtained from 2-4 mm small follicles (SF), dominant follicles (DF) at day 5 of the estrous cycle, ovulatory follicles (OF) 12h, 18h and 24h after injection of hCG and corpus luteum (CL) at day 5 of the estrous cycle, and were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting using a specific polyclonal antibody raised against the entire intracellular domain of mouse LRP8 protein, as described in *Materials and Methods*. *A*, Results from protein extracts (50 μ g/lane) of representative follicles and CL are shown. *B*, Relative intensities of 145,000 and 95,000 to 105,000 molecular weight bands were quantified by densitometry and are represented. Results are presented as means \pm SEM of two independent samples per group, and bars with different *letters* are significantly different ($P < 0.05$).

FIGURE 6

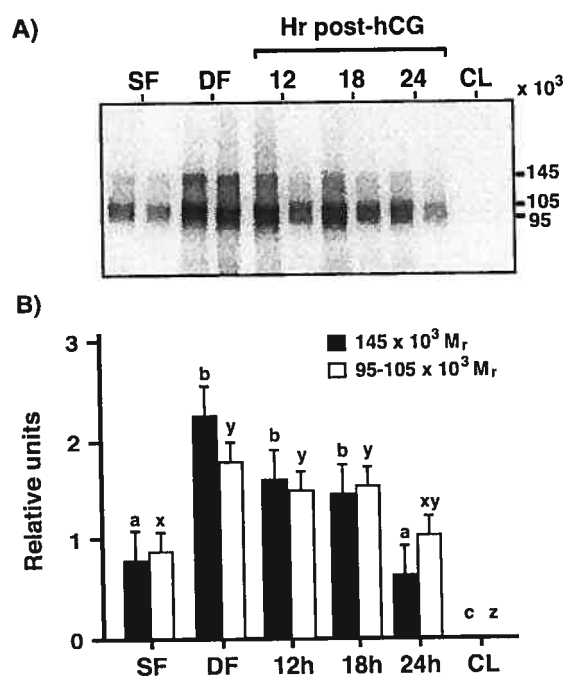


Fig. 7. Immunohistochemical localization of LRP8 in bovine ovarian follicles and corpus luteum. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed and paraffin embedded tissues incubated with anti-LRP8 antibody as described in *Materials and Methods*. The *scale bar* is equal to 0.1 mm if not otherwise stated. Staining was absent when the primary antibody was omitted or substituted with normal rabbit serum (data not shown). A, Follicular wall of dominant follicle at day 5 of the estrous cycle showing strong labeling in granulosa cells but negative in theca cells and stroma; B, enlargement of granulosa cells from dominant follicle presented in A. *Arrowheads* indicate LRP8 labeling located at the cytoplasmic membrane of granulosa cells (*bar* equal to 0.05 mm); C, follicular wall of ovulatory follicle obtained 24h after hCG injection showing a weaker signal in granulosa cells compared to dominant follicle in A; D, enlargement of granulosa cells from ovulatory follicle presented in B (*bar* equal to 0.05 mm); E, follicular wall of small follicle (2 mm) showing faint to absent staining; F, corpus luteum at day 5 of the estrous cycle showing unstained luteal cells (*A: antrum; G: granulosa; LC: luteal cells; T: theca*).

Figure 7

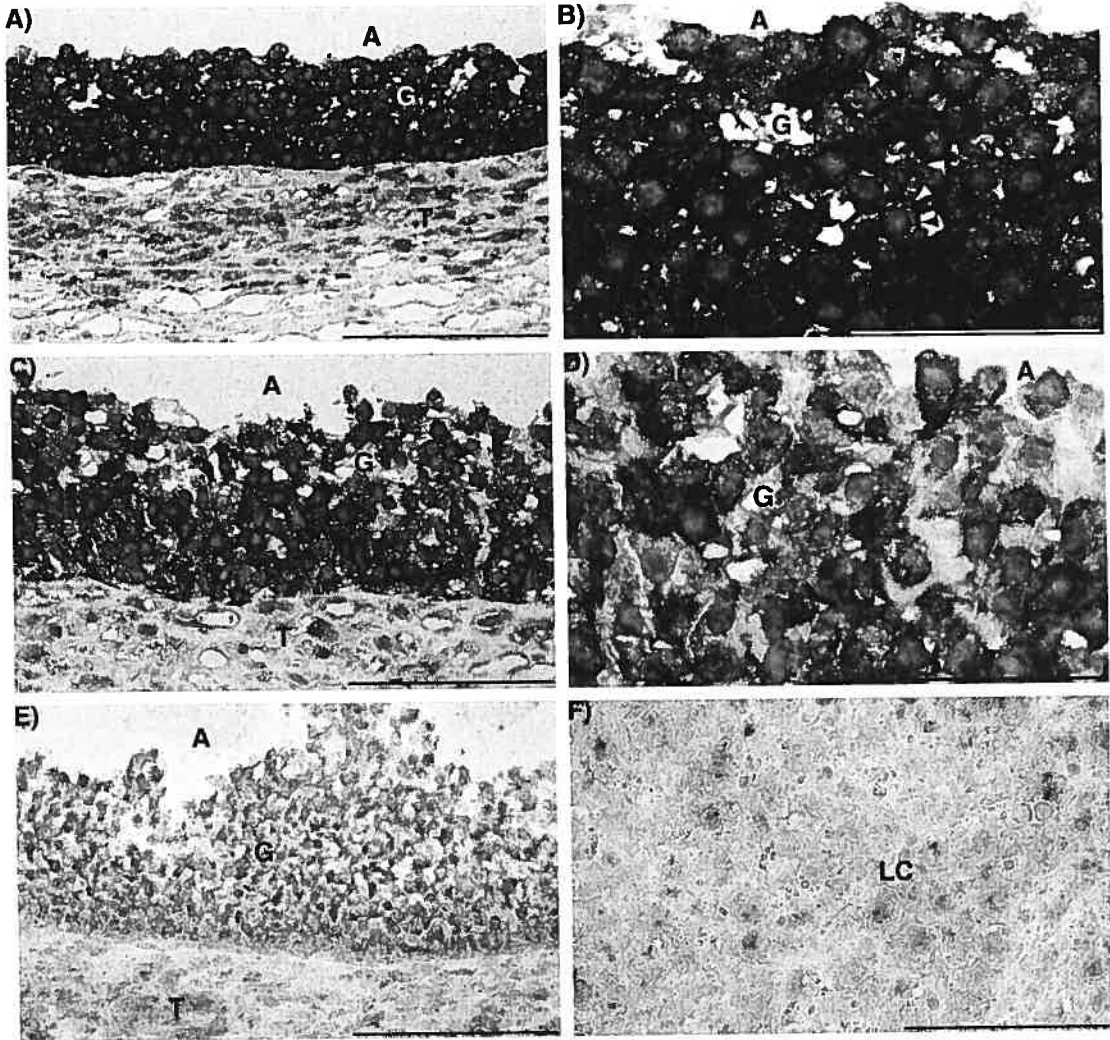
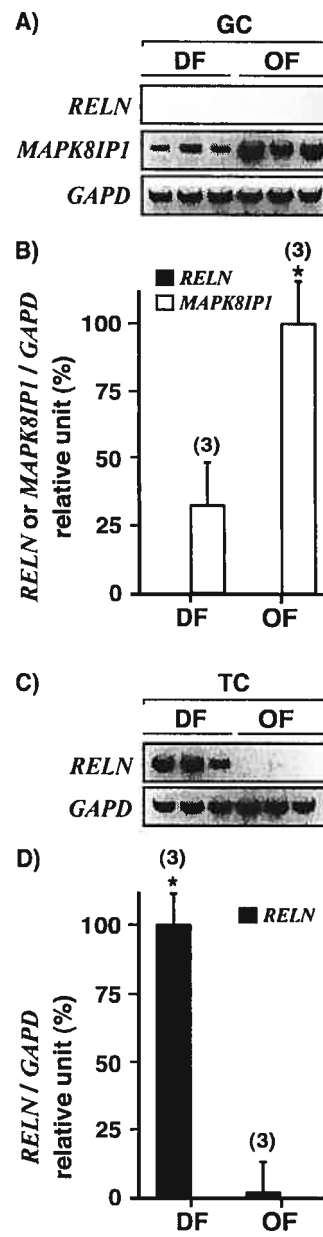


Fig. 8. Regulation of *RELN* and *MAPK8IP1* mRNA in bovine follicles. Total RNA was extracted from bovine granulosa cell (GC) or theca cell (TC) preparations collected from dominant follicles (DF) at day 5 of the estrous cycle and ovulatory follicles (OF) 24 h after injection of hCG, then used in mRNA expression analyses using semiquantitative RT-PCR as described in *Materials and Methods*. A, Expression of *RELN* (306 bp), *MAPK8IP1* (401 bp) and *GAPD* (710 bp) mRNAs in GC. B, The intensity of *RELN* and *MAPK8IP1* signals were normalized with the control gene *GAPD* and presented as relative changes in *RELN* and *MAPK8IP1* mRNA in GC. C, Expression of *RELN* (306 bp) and *GAPD* (710 bp) mRNAs in TC preparation. D, The intensity of *RELN* signals were normalized with the control gene *GAPD* and presented as relative changes in *RELN* mRNA in TC preparation. *Bars* marked with an *asterisk* are significantly different ($P < 0.05$). Data are presented as means \pm SEM, and the number of independent samples (*i.e.* animals per group) is indicated in parenthesis.

FIGURE 8



CHAPITRE 4

4. Discussion générale

4.1 Identification du transcriptome ovarien à l'aide d'approches génomiques à large échelle

Malgré l'identification et la caractérisation de plusieurs déterminants moléculaires impliqués dans la croissance du follicule ovarien, le profil d'expression génique complet nécessaire à la folliculogenèse n'a pas été élucidé. Notre objectif principal était d'identifier et de caractériser des nouveaux gènes exprimés au cours des étapes finales de la croissance et de la différenciation du follicule antral dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent la sélection et l'établissement de la dominance. Nous avons donc utilisé l'approche SSH et identifié des gènes qui sont plus fortement ou spécifiquement exprimés dans les cellules de la granulosa du follicule dominant (DF) comparativement aux petits follicules non sélectionnés (SF) (**chapitre 2**).

Au cours des dix dernières années, plusieurs approches génomiques à large échelle telles que l'établissement de génothèques d'ADNc, le DDRT-PCR, la SSH, le SAGE et les puces à ADN ont été utilisées chez plusieurs espèces dans le but d'identifier des nouveaux gènes exprimés dans des types cellulaires spécifiques de l'ovaire ou à différents stades du cycle ovarien (Hennebold, 2004). Parmi ces études, certaines ont permis l'identification de gènes différenciellement et spécifiquement exprimés dans l'ovaire, dans l'ovocyte ou dans les embryons à des stades précoces de développement (Hennebold et al., 2000; Rajkovic et al., 2001; Neilson et al., 2000; Taft et al., 2002; Zeng & Schultz, 2003). D'autres études ont utilisés le

DDRT-PCR ou les puces à ADN pour identifier des gènes induits en période ovulatoire chez les rats (Espey et al., 2002; Leo et al., 2001). En ce qui concerne l'identification de gènes différentiellement exprimés au cours du développement folliculaire, deux groupes ont utilisé un système *in vitro* et la technique de DDRT-PCR sur des cellules de granulosa de ratte traitées aux hormones (FSH versus contrôle (Ko et al., 2003) et FSH versus FSH + dihydrotestostérone (Slee et al., 2001)). Mis à part l'article 1 (**chapitre 2**), quatre autres études (dont deux de notre laboratoire) rapportent l'utilisation d'un système *in vivo* bovin pour l'identification de gènes impliqués dans le développement folliculaire, plus particulièrement dans l'établissement du follicule dominant (Bédard et al., 2003; Sisco et al., 2003; Ndiaye et al., 2005; Evans et al., 2004 (voir section 2.2.3)).

Sisco et al. (2003) ont utilisé une approche expérimentale très semblable à la notre (synchronisation du cycle œstral bovin et SSH) et avaient aussi pour objectif l'identification de gènes différentiellement exprimés dans le follicule dominant bovin. Cependant, les groupes de follicules ont été choisis en fonction de leur quantité en IGFbps dans le liquide folliculaire. Le DF a été identifié lorsque ses quantités en IGFBP 2, 4 et 5 étaient plus faibles comparativement aux follicules subalternes. Comme nous, ils ont identifié plusieurs gènes dont deux déjà connus comme étant différentiellement exprimés dans le follicule dominant comparativement aux petits follicules (CYP19A1 et INHBA) et deux dont l'expression n'était pas connue dans le follicule ovarien (LRP8 et CPD). Depuis la publication de notre étude, les gènes LRP8, CPD, CYP19A1 et INHBA ont aussi été isolés dans une autre étude SSH de notre laboratoire qui confirme qu'ils sont plus

fortement exprimés dans le follicule dominant comparativement au follicule ovulatoire 24 h suivant une stimulation à l'hCG (Ndiaye et al., 2005).

La mise en place de plusieurs techniques d'expression différentielle à grande échelle a permis l'identification de plusieurs nouveaux gènes exprimés dans des types cellulaires précis, sous des conditions variables, et qui pourraient être importants pour le fonctionnement normal ovarien. En ce qui concerne notre étude, dans le **chapitre 2**, nous mentionnons brièvement le rôle potentiel de certains gènes au cours du développement folliculaire et de la dominance. Il est à noter que nous avons aussi rapporté plusieurs EST. Certains de ces EST ont été identifiés à plusieurs reprises. L'identification de ces nombreux EST pourrait s'expliquer par la localisation de leur séquence en position 3' UTR, région d'homologie plus faible entre les espèces. D'autre part, l'existence d'ARN non codants pourrait aussi contribuer à ces EST car leurs séquences sont peu conservées entre les espèces (Costa, 2005). Il sera nécessaire de poursuivre la caractérisation de l'ADNc pleine longueur de chaque EST afin de les identifier. Le séquençage du génome bovin aidera à cette tâche. Pour l'ensemble des ADNc identifiés dans notre étude, la principale tâche sera de déterminer le rôle de chacun d'entre eux dans la physiologie ovarienne.

4.2 Identification d'un nouveau marqueur du follicule dominant bovin: LRP8

Les résultats obtenus par la technique SSH ont permis de développer le projet subséquent (**chapitre 3**) dans le lequel nous rapportons la caractérisation de

l'ADNc bovin d'un gène induit dans les cellules de granulosa du DF, soit LRP8. La caractérisation des transcrits différentiellement épissés a été réalisée ainsi que l'étude du profil d'expression de LRP8 au cours du développement folliculaire.

Parmi les treize nouveaux gènes identifiés pour la première fois comme étant différentiellement exprimés dans les GC de DF comparativement au SF, LRP8 est celui qui a été obtenu avec la plus forte redondance. En ce qui concerne le rôle potentiel de LRP8 dans la reproduction, les seules études rapportées en 2003 concernaient les souris; les souris mâles déficientes en LRP8 sont infertiles (Trommsdorff et al., 1999) et LRP8 est essentiel pour la maturation du spermatozoïde particulièrement pour l'acquisition et le développement de sa motilité (Andersen et al., 2003). Pour ce qui est des souris femelles déficientes en LRP8, leur fertilité semble normale puisque les auteurs ne mentionnent aucune dysfonction (Trommsdorff et al., 1999). Bien que la fertilité ne soit pas affectée chez ces souris, aucune étude plus poussée, telles que des coupes histologiques des ovaires n'a été effectuée (ou rapportée), ce qui ne permet pas de conclure que l'absence de LRP8 n'a aucun effet sur l'ovaire. D'autre part, les rôles physiologiques décrits dans la littérature (notamment la stéroïdogénèse et les différentes voies de signalisation cellulaire) faisaient de LRP8 un candidat intéressant et susceptible de jouer un rôle important au cours du développement folliculaire.

Brièvement, nos résultats rapportent que la séquence protéique de LRP8 bovin est bien conservée avec ses orthologues et que plusieurs isoformes sont

exprimés dans les CG du DF. De plus, l'expression protéique de LRP8 est plus abondante dans le DF comparativement au SF et sa localisation est spécifique aux CG. Même avant que le DF puisse être identifié morphologiquement ou par ses concentrations en IGFbps, l'ARNm de LRP8 est déjà uniquement exprimé dans un des trois plus gros follicules (Sisco et al., 2003). D'autre part, l'expression des transcrits et des protéines de LRP8 est réduite dans les OF 24 h suivant un traitement à l'hCG tandis qu'elle n'est pas détectable dans le CL au jour du 5 du cycle oestral. L'ensemble de ces résultats démontre que LRP8 est un nouveau marqueur de la croissance folliculaire finale en association au DF. LRP8 partage des caractéristiques moléculaires avec les récepteurs LDLR et VLDLR. Ces derniers sont impliqués dans l'importation du cholestérol extracellulaire qui sert de substrat pour la synthèse des hormones stéroïdiennes. Contrairement aux LDLR et VLDLR qui sont exprimés dans les GC de SF, de DF et de OF ainsi que dans le CL, le patron d'expression de LRP8 ne coïncide pas avec les besoins lipidiques nécessaires à la stéroïdogénèse au cours de l'ovulation et de la lutéinisation. Ces observations suggèrent que LRP8 serait plutôt impliqué dans des fonctions autres que celle de l'importation du cholestérol. En effet, nos résultats rapportent pour la première fois l'expression de l'ARNm de RELN dans les préparations de TC du DF et de l'ARNm de MAPK8IP1 dans les CG du DF, qui appartiennent à des voies de signalisation du récepteur LRP8. En ce qui concerne l'expression de l'ARNm codant pour DAB1, un partenaire d'interaction intracellulaire de LRP8 et VLDLR qui est impliqué dans la voie de signalisation déclenchée par la liaison extracellulaire de RELN à ces récepteurs, nos analyses RT-PCR démontrent un signal très faible et variable

(résultats non inclus dans le **chapitre 3**). Afin de confirmer l'expression protéique de RELN et DAB1 dans le follicule bovin, nous avons utilisé plusieurs anticorps commerciaux levés contre les protéines de souris. Malheureusement, les résultats d'immunobuvardage sur des extraits protéiques de GC ou TC de follicules bovins ont démontré la présence de plusieurs bandes non spécifiques pour DAB1 et aucune bande pour RELN. Ces résultats nous empêchent de tirer des conclusions (résultats non inclus dans le **chapitre 3**). Des anticorps dirigés contre les protéines recombinantes bovines devront être produits afin d'analyser et de localiser l'expression protéique de RELN, MAPK8IP1 et DAB1 au cours du développement folliculaire bovin.

Les objectifs à court et à moyen terme pour la suite de ce projet seront d'élucider les rôles potentiellement importants de LRP8 et des protéines impliquées dans ses cascades de signalisation au cours du développement et de la dominance folliculaires (voir section 5).

4.3 Voies de signalisation cellulaire de LRP8 et hypothèses quant à leurs rôles potentiels dans le follicule ovarien

Les principales voies de signalisation de LRP8, en grande partie identifiées dans le cerveau, ont été mentionnées dans le **chapitre 3**. Nous avons jugé intéressant de décrire en détails celles dont les fonctions pourraient potentiellement être transposables dans le follicule ovarien dans cette section de la thèse.

4.3.1 Lien entre la signalisation par RELN, l'adhésion cellulaire et le cytosquelette

Une des voies de signalisation par RELN concerne les intégrines et l'adhésion cellulaire. En effet, un autre récepteur connu de RELN est celui de l'intégrine $\alpha 3$ - $\beta 1$ qui lie la portion amino-terminale de RELN, sur un site distinct de celui qui permet la liaison au VLDLR ou LRP8 (Schmid et al., 2005). Les interactions entre RELN et l'intégrine $\alpha 3$ - $\beta 1$ contribueraient au positionnement adéquat des neurones dans le cortex cérébral en développement (Schmid et al., 2005). De plus, DAB1 peut aussi s'associer à la portion cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ (Schmid et al., 2005). Les intégrines sont une famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés de sous-unités α et β et sont des récepteurs d'adhésion à la surface cellulaire (Shih et al., 1993). Leurs ligands sont des molécules de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la fibronectine, la vitronectine, la laminine, etc. (Giebel et al., 1996). Dans le follicule ovarien, plusieurs sous-unités de l'intégrine, dont $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 1$ sont présentes en grande quantité (Giebel et al., 1996; Van Wezel et al., 1998; Rodgers et al., 1999). D'autre part, différentes protéines de la matrice extracellulaire sont impliquées dans la folliculogenèse, l'ovulation et ou la lutéinisation via leur interaction avec les intégrines (Leardkamolkarn & Abrahamson, 1992; Zhao et al., 1995; Bellego et al., 2002). Puisque le récepteur de l'intégrine $\alpha 3$ - $\beta 1$ est exprimé dans le follicule ovarien et que nos résultats démontrent pour la première fois qu'un de ses ligands, RELN, est aussi présent, nous pouvons émettre l'hypothèse que RELN aurait un rôle à jouer

dans les actions de l'intégrine $\alpha 3\text{-}\beta 1$ sur la survie et la prolifération des GC au cours du développement folliculaire.

D'autre part, un lien semble exister entre la signalisation par RELN/LRP8 et l'organisation des filaments d'actine reconnus comme étant impliqués dans la morphologie cellulaire et la motilité.

Tel que mentionné dans le **chapitre 3**, RELN interagit aux portions extracellulaires de LRP8 et VLDLR qui lient DAB1 via leur séquence peptidique N-P-X-Y dans leurs portions cytoplasmiques (Trommsdorff et al., 1999; Howell et al., 1999). De plus, la formation du complexe RELN-récepteur est un pré-requis pour que DAB1 soit phosphorylé (Hiesberger et al., 1999). Plusieurs expériences suggèrent que la phosphorylation du résidu tyrosine de DAB1 est essentielle à l'action de RELN sur les neurones lors de la formation du système nerveux (Pramatarova et al., 2003). En effet, plusieurs protéines ont été identifiées n'interagissant qu'avec la protéine DAB1 phosphorylée (Pramatarova et al., 2003). C'est le cas de la « Noncatalytic region of tyrosine kinase, beta » (Nck β), une protéine adaptatrice impliquée dans le remodelage de l'actine (Buday et al., 2002; Pramatarova et al., 2003). Le modèle de neurones en culture a démontré que la stimulation par RELN provoque une redistribution de Nck β aux sites d'action de RELN (Pramatarova et al., 2003). De plus, lorsque Nck β est surexprimé et co-transfecté avec DAB1 phosphorylé dans des fibroblastes en culture, on observe une modification des filaments d'actine (Pramatarova et al., 2003). Il a donc été proposé que la protéine DAB1 phosphorylée recruterait Nck β dans les compartiments

membranaires où ce complexe remodelerait le cytosquelette en agissant sur l'organisation des filaments d'actine. De plus, DAB1 interagit et active la « Wiskott-Aldrich syndrome protein » (N-WASP), une protéine qui contrôle la polymérisation de l'actine (Suetsugu et al., 2004). En effet, la surexpression de N-WASP dans différentes lignées cellulaires provoque la polymérisation ectopique de l'actine au niveau des sites enrichis en N-WASP et cette réorganisation de l'actine est dépendante de la « cell division cycle 42 » (Cdc42), qui appartient à la superfamille des « Ras homolog gene family, guanosine triphosphatases » (RhoGTPases) (Symons et al., 1996).

Un autre lien entre la voie de signalisation par LRP8 et l'actine existe via l'interaction entre la protéine MAPK8IP1, qui lie spécifiquement l'insertion cytoplasmique intracellulaire présente dans un des isoformes de LRP8 et la protéine « Rho guanine nucleotide exchange factor » (RhoGEF) (tel que mentionné dans le **chapitre 3**). Comme Cdc42, RhoGEF appartient aussi à la famille RhoGTPases mais interagit spécifiquement en tant que facteur d'échange de la guanine avec la protéine « Ras homolog gene family, member A » (RhoA). Les protéines de la famille des RhoGTPases sont reconnues pour leurs actions dans plusieurs processus cellulaires notamment ceux qui agissent sur la morphologie cellulaire via l'organisation et la polymérisation de l'actine (Symons, 1996). Cependant, le rôle de l'interaction entre MAPK8IP1 et RhoGEF dans la voie de signalisation de LRP8 au cours du développement neuronal demeure inconnu.

En ce qui concerne le follicule ovarien, il a été suggéré que la stéroïdogénèse peut être augmentée grâce au réarrangement du cytosquelette notamment des

filaments de l'actine. Cette réorganisation permettrait le rassemblement des organelles impliqués dans la stéroïdogénèse tels que les gouttelettes lipidiques, les lysosomes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Amsterdam et al., 1999). De plus, l'expression de l'ARNm de l'actine et de plusieurs protéines associées à l'actine est diminuée dans les cellules de granulosa humaines en culture stimulées à la LH, la FSH et la forskolin (Sasson et al., 2004). L'expression de l'actine est donc contrôlée dans les GC et aurait aussi possiblement un rôle à jouer dans la stéroïdogénèse folliculaire. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les systèmes RELN/LRP8/DAB1 et/ou RELN/LRP8/MAPK8IP1 agiraient sur la polymérisation et/ou la localisation de l'actine ce qui contribuerait à moduler ses actions au cours du développement folliculaire et de la dominance.

En conclusion, les souris déficientes en LRP8 et VLDLR ont permis d'identifier que ces deux récepteurs font partie d'une voie de signalisation impliquant RELN, DAB1 et plusieurs autres protéines intracellulaires. D'autre part, un des isoformes de LRP8 interagit spécifiquement avec MAPK8IP1 et serait impliqué dans d'autres cascades intracellulaires. Ces différentes voies de signalisation agiraient sur le cytosquelette et/ou l'adhésion cellulaire. Nous émettons l'hypothèse que ces mêmes cascades pourraient être essentielles au développement folliculaire au cours duquel le remodelage et les interactions entre les différents compartiments folliculaires (thèque, granulosa et ovocyte) sont déterminants pour la mise en place du follicule dominant (voir **chapitre 1**).

4.3.2 Lien entre LRP8 et la voie de signalisation de « cJUN amino-terminal kinase » (JNK)

Les voies de signalisation des « Mitogen-activated protein kinase » (MAPK) jouent des rôles importants dans une grande variété de processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation et la mort cellulaires (Minden & Karin, 1997; Schaeffer & Weber, 1999). Une des quatre grandes familles des MAPK est celle de JNK (Fanger et al., 1997). La voie de signalisation JNK est activée en réponse à plusieurs stress cellulaires ou par des cytokines pro-inflammatoires telles que TNFA (Minden & Karin, 1997). La cascade de signalisation de JNK est composée de JNK, de « JNK-activated kinase 1 » (JNKK1) ou « JNK-activating kinase 2 » (JNKK2) et de MAPKKK telles que « Mixed-lineage protein kinase 3 » (MLK3) (Heo et al., 2004). La coordination de l'interaction des trois composants nécessaires de la voie (MAPK/MAPKK/MAPKKK) est assurée par des protéines d'échafaudage telles que MAPK8IP1 (Morrison et al., 2003). D'autre part, il a été suggéré que via son interaction avec LRP8, MAPK8IP1 recruterait JNK, JNKK1 et MLK3 à la membrane plasmique (Nimpf & Schneider, 2000). Récemment, une étude a rapporté que l'exon 19 de LRP8 (qui code pour l'insertion cytoplasmique de 59 acides aminés et qui interagit notamment avec MAPK8IP1 et -2) est important pour la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire dans le cerveau adulte (Beffert et al., 2005).

En ce qui concerne l'ovaire, peu d'articles rapportent l'étude de l'activation des voies de signalisation des MAPK dans les cellules de granulosa. Il a été démontré que les voies « extracellular response kinase » (ERK) et « p38 map

kinase » (p38) sont requises pour la survie des cellules de granulosa et sont impliquées dans les actions de la FSH sur la croissance folliculaire (Kotani et al., 1999; Shiota et al., 2003; Gebauer et al., 1999). D'autre part, il a été suggéré que l'activation de p38 préviendrait l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène dans les cellules de granulosa (Tamura et al., 2004). En ce qui concerne la voie JNK, des résultats non publiés mentionnés dans Tamura et al. (2004) rapportent que le traitement de cellules de granulosa en culture avec du peroxyde d'hydrogène activerait la voie JNK au cours du processus d'apoptose. Aussi, la quantité de protéines JNK1 et -2 phosphorylées serait plus abondante dans les cellules de granulosa en apoptose (Uma et al., 2003).

Nous rapportons dans le **chapitre 3** que l'expression de l'ARNm de MAPK8IP1 augmente dans les cellules de granulosa des OF stimulés à l'hCG, moment où l'expression de LRP8 diminue. Nous suggérons aussi que MAPK8IP1 pourrait moduler l'activité de JNK au cours du processus ovulatoire, via une voie n'impliquant pas LRP8. Notamment, il a été rapporté que JNK active l'expression de RHOX5, un facteur de transcription membre du « reproductive homeobox X-linked (RHOX) gene cluster » identifié sur le chromosome X murin (Maclean et al., 2005). RHOX5 est exprimé dans les cellules de granulosa murales des follicules ovulatoires murins et l'expression de l'ARNm de RHOX5 augmente suite à un traitement à l'hCG, atteint son niveau maximal juste avant l'ovulation (lors des premières étapes du processus ovulatoire) et diminue de façon drastique au moment de l'ovulation (Pitman et al., 1998; Maclean et al., 2005). De plus, il a été démontré que des facteurs de transcription qui agissent de concert avec la voie de signalisation

des JNK sont requis pour l'expression de RHOX5 (Maclean et al., 2005). Le rôle exact de RHOX5 dans les cellules de granulosa n'est pas encore connu. Cependant nous émettons l'hypothèse que dans le OF post-hCG, MAPK8IP1 pourrait interagir avec JNK et moduler l'expression de RHOX5 et ainsi affecter l'expression des gènes cibles de RHOX5, qui pourraient être impliqués dans le début du processus ovulatoire.

Dans l'ensemble, les voies des MAPK dont celle de JNK sont présentes dans les cellules de granulosa et semblent être activées en réponse à des stress cellulaires. Cependant, le rôle exact de la voie JNK dans le follicule en croissance et le DF n'est pas connu. Puisque notre étude rapporte que RELN, LRP8 et MAPK8IP1 sont présents dans le DF, nous émettons l'hypothèse que la voie JNK pourrait être activée dans les GC par la liaison de RELN à LRP8. Les conséquences de cette activation sur la survie, la prolifération et l'apoptose des GC du DF resteraient à déterminer.

5. Perspectives

Dans le but de mieux comprendre le rôle physiologique de LRP8 et de ses partenaires d'interaction au cours de la croissance et de la dominance folliculaires, plusieurs approches expérimentales pourront être mises en place.

Afin d'étudier le contrôle de l'expression de LRP8 par les hormones stéroïdiennes et gonadotropines au cours du développement folliculaire, plus spécifiquement lors du processus de déviation et de sélection, un système de culture *in vitro* pourrait être utilisé. Des GC bovines isolées de follicules de diamètres entre 4 et 7 mm pourraient être mises en culture et des concentrations croissantes en oestradiol, en FSH, en progestérone ou une combinaison d'oestradiol et FSH sont ajoutées au milieu de culture. L'ajout de la protéine recombinante RELN pourra aussi être effectuée. Des analyses RT-PCR permettront de détecter l'expression de l'ARNm LRP8 ainsi que d'autres gènes impliqués dans ses voies de signalisation (DAB1, MAPK8IP1-2, etc.), en présence des différentes doses d'hormones ou de RELN. Pour effectuer des études similaires mais dans le but d'étudier l'effet des hormones et de RELN au cours du développement final du follicule, essentiellement suite à la déviation, différentes concentrations de LH seront ajoutées au milieu de culture de GC isolées à partir de follicules de diamètres de 8 à 10 mm. De plus, les rôles potentiels de RELN sur les actions de l'intégrine $\alpha 3\text{-}\beta 1$ et de RELN/LRP8 sur l'organisation du cytosquelette devront aussi être étudiés dans un système de GC en culture. Leurs effets sur la survie, la prolifération et la stéroïdogénèse des GC seront déterminés notamment par des analyses immunohistochimiques.

D'autre part, vu que l'expression de LRP8 est réduite suite à une injection d'hCG, l'étude de son promoteur et l'identification de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de son expression pourraient s'avérer intéressantes. En fait, lors du criblage de la librairie de phages qui nous a permis d'isoler la portion manquante en 5' de la séquence codante de LRP8, nous avons aussi isolé une bonne partie de son promoteur. L'effet de la forskolin, qui mime l'action de l'AMPc, sur l'expression de l'ARNm et de la protéine LRP8 dans des cultures primaires de GC pourra être effectuée par RT-PCR et immunobuvardage. Par la suite, les régions promotrices impliquées dans la régulation par la forskolin seront déterminées en effectuant des essais transcriptionnels avec des mutants de délétion du promoteur couplés à un gène rapporteur. Éventuellement, la capacité de liaison de facteurs de transcription aux sites de régulation identifiés sur le promoteur de LRP8 sera évaluée par des analyses « electrophoretic mobility shift assay » (EMSA) et des « chromatin immunoprecipitation » (ChIP) sur des extraits nucléaires de GC.

Des anticorps polyclonaux levés contre des protéines recombinantes correspondant à des portions de RELN, MAPK8IP1 et DAB1 bovines devront être produits. Ces anticorps spécifiques seront utilisés afin de confirmer l'expression de ces protéines dans le DF et pour identifier leur localisation cellulaire. Également, des études d'immunoprécipitation nous permettront de déterminer si LRP8 interagit avec DAB1 dans les cultures primaires de GC.

Pour l'ensemble de ces expériences *in vitro*, il faut considérer qu'il y a de nombreuses différences avec le modèle *in vivo*. En effet, la manipulation/dissection

des cellules, leur mise en culture, les composants présents dans le milieu de culture, les concentrations d'hormones utilisées, l'absence de l'environnement naturel du follicule, etc. font en sorte que les systèmes de cultures primaires de GC ou de TC ne reproduisent que partiellement les événements se déroulant dans l'ovaire. En effet, les GC mises en culture pour une période de 24 heures ont démontré un changement de leur profil d'expression protéique, ce qui limite l'utilisation de cette approche et justifie l'utilisation courante d'un modèle *in vivo* pour l'étude de la physiologie du follicule ovarien (Skinner & Osteen, 1988).

D'autre part, puisque les souris déficientes en LRP8 ont été produites, il serait intéressant de réaliser des analyses histochimiques de coupes d'ovaire afin de déterminer si l'absence de LRP8 a un effet sur la morphologie, la taille, le statut physiologique, le nombre des follicules. De plus, bien que la souris ne soit pas un bon modèle pour l'étude de la dominance folliculaire puisque poly-ovulatoire, certaines approches expérimentales décrites en perspective pourraient être effectuées sur des cellules de granulosa de souris. L'utilisation de ce modèle animal rendrait certaines expériences plus faciles notamment en ce qui concerne la possibilité d'utiliser des anticorps commerciaux déjà disponibles et l'accessibilité à un grand nombre d'animaux. Cependant, il faudra préalablement vérifier si LRP8 est exprimé dans les follicules murins.

De plus, plusieurs autres gènes ont été identifiés par SSH comme étant préférentiellement exprimés dans le DF (**chapitre 2**). Il faudra poursuivre leur étude

et effectuer la validation de leur expression différentielle dans les GC de DF soit par RT-PCR et/ou immunobuvardage afin de confirmer leur forte expression dans le DF comparativement aux autres follicules. Éventuellement, le but sera de déterminer et d'intégrer les rôles potentiels de ces nouveaux gènes au cours de la mise en place de la dominance folliculaire.

6. Conclusion générale

L'établissement d'une génothèque soustraite d'ADNc par l'approche SSH nous a permis d'identifier de nouveaux gènes différentiellement exprimés dans les CG du follicule dominant bovin. Dans le futur, la caractérisation et l'étude de ces gènes contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes associés à la croissance folliculaire terminale, à la sélection et à la dominance chez les espèces mono-ovulatoires.

De plus, nous avons caractérisé la séquence bovine d'un nouveau marqueur de la dominance folliculaire, le gène LRP8 et démontré que son expression est exclusive aux CG et prédominante dans le DF. Nous avons aussi rapporté pour la première fois l'expression de gènes impliqués dans une des voies de signalisation de LRP8; il s'agit de l'expression de l'ARNm de RELN dans les thèques du DF et de celle de l'ARNm de MAPK8IP1 dans les GC du DF. D'après les fonctions connues des voies de signalisation auxquelles participent RELN, LRP8 et MAPK8IP1, principalement décrites dans les neurones, nos résultats suggèrent que des cascades similaires pourraient exister dans le DF et participer à la mise en place de la dominance en agissant sur le cytosquelette, l'adhésion cellulaire, la stéroïdogénèse, la survie cellulaire et/ou l'apoptose.

7. Références

- Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J Reprod Fertil.* 1992; 96(2):627-640.
- Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83:127-140.
- Adashi EY, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarellie E, Hernandez ER, Roberts CT, Leroith D, Rosenfeld R. The intra-ovarian IGF system. *Growth Regul.* 1992; 2(1):10-15.
- Adashi EY, Resnick CE, Twardzik DR. Transforming growth factor-alpha attenuates the acquisition of aromatase activity by cultured rat granulosa cells. *J Cell Biochem.* 1987; 33(1):1-13.
- Akopian AN, Wood JN. Peripheral nervous system-specific genes identified by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem.* 1995; 270(36):21264-21270.
- Amsterdam A, Gold RS, Hosokawa K, Yoshida Y, Sasson R, Jung Y, Kotsuji F. Crosstalk Among Multiple Signaling Pathways Controlling Ovarian Cell Death. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10(7):255-262.
- Amsterdam A, Sasson R, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Rimon E, Land A, Cohen T, Dor Y, Hirsh L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(8):1355-1362.
- Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ, Webb R, Sinclair KD. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod.* 2001; 64(6):1624-1632.
- Armstrong DG, Gutierrez CG, Baxter G, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ, Hogg CO, Webb R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J Endocrinol.* 2000; 165(1):101-113.
- Andersen OM, Yeung CH, Vorum H, Wellner M, Andreassen TK, Erdmann B, Mueller EC, Herz J, Otto A, Cooper TG, Willnow TE. Essential role of the apolipoprotein E receptor-2 in sperm development. *J Biol Chem.* 2003; 278(26):23989-23995.
- Austin EJ, Mihm M, Evans AC, Knight PG, Ireland JL, Ireland JJ, Roche JF. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of

follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod.* 2001; 64(3):839-848.

Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De La Sota RL, Thatcher WW. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod.* 1992; 47(5):871-883.

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A. Effects of an Igfl gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol.* 1996; 10(7):903-918.

Band MR, Olmstead C, Everts RE, Liu ZL, Lewin HA. A 3800 gene microarray for cattle functional genomics: comparison of gene expression in spleen, placenta, and brain. *Anim Biotechnol.* 2002; 13(1):163-172.

Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci.* 1998; 76(7):1903-1921.

Bedard J, Brule S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG. Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev.* 2003; 64(2):152-165.

Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelmann G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron.* 2005; 47(4):567-79.

Le Bellego F, Pisselet C, Huet C, Monget P, Monniaux D. Laminin-alpha6beta1 integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. *J Endocrinol.* 2002; 172(1):45-59.

Bendell JJ, Dorrington JH. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1990; 127(2):533-540.

Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol.* 2000; 167(3):371-382.

Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 1993; 133(5):2204-2212.

Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res.* 1961; 24:495-507.

Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 187(1-2):11-18.

Britt KL, Drummond AE, Dyson M, Wreford NG, Jones ME, Simpson ER, Findlay JK. The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 79(1-5):181-185.

Buday L, Wunderlich L, Tamas P. The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal.* 2002; 14(9):723-31.

Burghardt RC, Anderson E. Hormonal modulation of gap junctions in rat ovarian follicles. *Cell Tissue Res.* 1981; 214(1):181-193.

Burton JL, Madsen SA, Yao J, Sipkovsky SS, Coussens PM. An immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression and mastitis susceptibility in dairy cows. *Acta Vet Scand.* 2001; 42(3):407-424.

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science.* 2003; 301(5630):215-218.

Chapman SC, Woodruff TK. Betaglycan localization in the female rat pituitary: implications for the regulation of follicle-stimulating hormone by inhibin. *Endocrinology.* 2003; 144(12):5640-5649.

Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod Dev.* 1990; 26(3):236-247.

Christenson LK, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1529(1-3):175-187.

Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1994; 135(5):1845-1853.

Chung BC, Matteson KJ, Voutilainen R, Mohandas TK, Miller WL. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(23):8962-8966.

Conover CA, Faessen GF, Ilg KE, Chandrasekher YA, Christiansen M, Overgaard MT, Oxvig C, Giudice LC. Pregnancy-associated plasma protein-a is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells

and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. *Endocrinology*. 2001; 142(5):2155-2158.

Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF. Circulating FSH isoform patterns during recurrent increases in FSH throughout the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 1997; 110(2):339-345.

Costa FF. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene*. 2005; 357:83-94.

Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. 1999; 286(5448):2328-2331.

Couse JF, Korach KS. Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1999; 60(2):143-148.

Dalbies-Tran R, Mermillod P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biol Reprod*. 2003; 68(1):252-261.

Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology*. 1999; 140(6):2685-2695.

Dean J. Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest*. 1992; 89(4):1055-1059.

Dekel N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev Reprod*. 1996; 1(2):82-88.

De la Sota RL, Simmen FA, Diaz T, Thatcher WW. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol Reprod*. 1996; 55(4):803-812.

Deleersnijder W, Hong G, Cortvrindt R, Poirier C, Tylzanowski P, Pittois K, Van Marck E, Merregaert J. Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins. *J Biol Chem*. 1996; 271(32):19475-19482.

Deziel DJ. Ultrasonography and the surgeon. *Surg Endosc*. 1996; 10(6):615-616.

Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*. 1999; 303:349-380.

- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(12):6025-6030.
- Downs SM. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Dev*. 1993; 35(1):82-94.
- Driancourt MA, Thatcher WW, Terqui M, Andrieu D. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domest Anim Endocrinol*. 1991; 8(2):209-221.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development*. 2000; 127(19):4277-4291.
- Echternkamp SE, Howard HJ, Roberts AJ, Grizzle J, Wise T. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol Reprod*. 1994; 51(5):971-981.
- Eddy EM, Clark JM, Gong D, Fenderson BA. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Res*. 1981; 4:333-361.
- Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(18):10288-10293.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 2001; 122(6):829-838.
- Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*. 1996; 8(4):485-489.
- Espey LL, Richards JS. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biol Reprod*. 2002; 67(6):1662-1670.
- Erickson BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*. 1966; 25(3):800-805.

Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11(5):193-198.

Ethier JF, Findlay JK. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction.* 2001; 121(5):667-675.

Evans AC, Ireland JL, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod.* 2004; 70(5):1475-1484.

Evans AC, Komar CM, Wandji SA, Fortune JE. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod.* 1997; 57(2):394-401.

Evans AC, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 1997; 138(7):2963-2971.

Everts RE, Band MR, Liu ZL, Kumar CG, Liu L, Looor JJ, Oliveira R, Lewin HA. A 7872 cDNA microarray and its use in bovine functional genomics. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 105(3-4):235-245.

Driancourt MA, Thatcher WW, Terqui M, Andrieu D. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domest Anim Endocrinol.* 1991; 8(2):209-221.

Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl).* 1997; 195(4):327-336.

Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev.* 1995; 42(4):437-442.

Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev.* 1997; 7(1):67-74.

Fernig DG, Gallagher JT. Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog Growth Factor Res.* 1994; 5(4):353-377.

Fevold HR, Lorence MC, McCarthy JL, Trant JM, Kagimoto M, Waterman MR, Mason JJ. Rat P450(17 alpha) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions. *Mol Endocrinol.* 1989; 3(6):968-975.

Fielding CJ, Fielding PE. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529(1-3):210-222.

Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*. 2001; 65(3):648-654.

Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 163(1-2):53-60.

Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*. 1994; 50(2):225-232.

Fortune JE. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod*. 1986; 35(2):292-299.

Fulop C, Szanto S, Mukhopadhyay D, Bardos T, Kamath RV, Rugg MS, Day AJ, Salustri A, Hascall VC, Glant TT, Mikecz K. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*. 2003; 130(10):2253-2261.

Gebauer G, Peter AT, Onesime D, Dhanasekaran N. Apoptosis of ovarian granulosa cells: correlation with the reduced activity of ERK-signaling module. *J Cell Biochem*. 1999; 75(4):547-554.

Giebel J, de Souza P, Rune GM. Expression of integrins in marmoset (*Callithrix jacchus*) ovary during folliculogenesis. *Tissue Cell*. 1996; 28(4):379-85.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*. 2004; 82-83:431-446.

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990; 110:521-528.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*. 2001;65(3):638-647.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology*. 1999;52(6):1079-1093.

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*. 1996; 55(6):1187-1194.

Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing

hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod.* 1996; 55(1):68-74.

Good TE, Weber PS, Ireland JL, Pulaski J, Padmanabhan V, Schneyer AL, Lambert-Messerlian G, Ghosh BR, Miller WL, Groome N, Ireland JJ. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biol Reprod.* 1995; 53(6):1478-1488.

Gospodarowicz D, Bialecki H. The effects of the epidermal and fibroblast growth factors on the replicative lifespan of cultured bovine granulosa cells. *Endocrinology.* 1978; 103(3):854-865.

Gray PC, Bilezikjian LM, Vale W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 180(1-2):47-53.

Gregory F, Erickson PhD. Role of Growth Factors in Ovary Organogenesis. *J Soc Gynecol Investig.* 2001; 8(1)(Supplement):S13-S16.

Guilbault LA, Rouillier P, Matton P, Glencross RG, Beard AJ, Knight PG. Relationships between the level of atresia and inhibin contents (alpha subunit and alpha-beta dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biol Reprod.* 1993; 48(2):268-276.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod.* 2004; 70(4):900-909.

Hashizume K, Ishiwata H, Kizaki K, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Akagi S, Shimizu M, Takahashi S, Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Tsujimoto G, Todoroki J, Izaike Y. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning Stem Cells.* 2002; 4(3):197-209.

Herath CB, Shiojima S, Ishiwata H, Katsuma S, Kadowaki T, Ushizawa K, Imai K, Takahashi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Hashizume K. Pregnancy-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the liver of cow throughout pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313(3):666-680.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407(6805):770-776.

Hennebold JD. Characterization of the ovarian transcriptome through the use of differential analysis of gene expression methodologies. *Hum Reprod Update.* 2004; 10(3):227-239.

Hennebold JD, Tanaka M, Saito J, Hanson BR, Adashi EY. Ovary-selective genes I: the generation and characterization of an ovary-selective complementary deoxyribonucleic acid library. *Endocrinology*. 2000; 141(8):2725-2734.

Heo YS, Kim SK, Seo CI, Kim YK, Sung BJ, Lee HS, Lee JI, Park SY, Kim JH, Hwang KY, Hyun YL, Jeon YH, Ro S, Cho JM, Lee TG, Yang CH. Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *EMBO J*. 2004; 23(11):2185-2195.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*. 1994; 100(1-2):51-54.

Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*. 1999; 24(2):481-9.

Hinsch KD, Hinsch E. The zona pellucida 'receptors' ZP1, ZP2 and ZP3. *Andrologia*. 1999; 31(5):320-322.

Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(18):10501-10506.

Hosokawa K, Aharoni D, Dantes A, Shaulian E, Schere-Levy C, Atzmon R, Kotsuji F, Oren M, Vlodaysky I, Amsterdam A. Modulation of Mdm2 expression and p53-induced apoptosis in immortalized human ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 1998; 139(11):4688-4700.

Howell BW, Lanier LM, Frank R, Gertler FB, Cooper JA. The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(7):5179-5188.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafiri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*. 1994; 15(6):707-724.

Hughes FM Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*. 1991; 129(5):2415-2422.

Hulshof SC, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, van den Hurk R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Q.* 1994; 16(2):78-80.

Ireland JL, Good TE, Knight PG, Ireland JJ. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol Reprod.* 1994; 50(6):1265-1276.

Ireland JJ, Roche JF. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 1982; 111(6):2077-2086.

Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel OV, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaike Y, Todoroki J, Hashizume K. Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. *Mol Reprod Dev.* 2003; 65(1):9-18.

Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell.* 2005; 122(2):303-315.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature.* 2004; 428(6979):145-150.

Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine.* 1999; 10(1):43-51.

Joyce IM, Pendola FL, O'Brien M, Eppig JJ. Regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 messenger ribonucleic acid expression in mouse granulosa cells during ovulation. *Endocrinology.* 2001; 142(7):3187-3197.

Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 1999; 60(5):1263-1270.

Kadokia R, Arraztoa JA, Bondy C, Zhou J. Granulosa cell proliferation is impaired in the Igfl null ovary. *Growth Horm IGF Res.* 2001; 11(4):220-224.

Kalra SP, Horvath T, Naftolin F, Xu B, Pu S, Kalra PS. The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GNRH) system. *J Neuroendocrinol.* 1997; 9(8):569-576.

Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*. 2003; 144(8):3329-3337.

Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2002; 123(5):613-620.

Kidgell C, Winzeler EA. Elucidating genetic diversity with oligonucleotide arrays. *Chromosome Res*. 2005; 13(3):225-235.

Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*. 1998; 138(5):482-491.

Knight PG, Glister C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*. 2003; 78(3-4):165-183.

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

Ko C, Grieshaber NA, Ji I, Ji TH. Follicle-stimulating hormone suppresses cytosolic 3,5,3'-triiodothyronine-binding protein messenger ribonucleic acid expression in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 2003; 144(6):2360-2367.

Kotani E, Sugimoto M, Kamata H, Fujii N, Saitoh M, Usuki S, Kubo T, Song K, Miyazaki M, Murakami K, Miyazaki H. Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. *Am J Physiol*. 1999; 276:25-33.

Koubova J, Douglas BM, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *PNAS*. 2006; 103(8):2474-2479.

Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(26):15677-15682.

Kruip TA, Dieleman SJ. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod Nutr Dev*. 1982; 22(3):465-473.

Kuno K, Terashima Y, Matsushima K. ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1999; 274(26):18821-18826.

Larsen WJ, Wert SE. Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development. *Tissue Cell*. 1988; 20(6):809-848.

- Leardkamolkarn V, Abrahamson DR. Immunoelectron microscopic localization of laminin in rat ovarian follicles. *Anat Rec.* 1992; 233(1):41-52.
- Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavriline G, Milbrandt J. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science.* 1996; 273(5279):1219-1221.
- Leo CP, Pisarska MD, Hsueh AJ. DNA array analysis of changes in preovulatory gene expression in the rat ovary. *Biol Reprod.* 2001; 65(1):269-276.
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992; 257(5072):967-971.
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science.* 1993; 259(5097):946-951.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993; 75(1):59-72.
- Lobb DK, Dorrington JH. Transforming growth factor-alpha: identification in bovine corpus luteum by immunohistochemistry and northern blot analysis. *Reprod Fertil Dev.* 1993; 5(5):523-529.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1994; 37(1):48-53.
- Lussier JG, Matton P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, Carruthers TD. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J Reprod Fertil.* 1994; 102(1):95-105.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil.* 1987; 81(2):301-307.
- MacLean JA 2nd, Rao MK, Doyle KM, Richards JS, Wilkinson MF. Regulation of the *Rhox5* homeobox gene in primary granulosa cells: preovulatory expression and dependence on SP1/SP3 and GABP. *Biol Reprod.* 2005; 73(6):1126-1134.
- Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, Maeda A, Sakamaki K, Miyano T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev.* 2004; 50(5):493-514.
- Matzuk MM. Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 163(1-2):61-66.

Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, Bradley A. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature*. 1995; 374(6520):354-356.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MP. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*. 2005; 129(4):481-487.

Mihm M, Crowe MA, Knight PG, Austin EJ. Follicle wave growth in cattle. *Reprod Domest Anim*. 2002; 37(4):191-200.

Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1333(2):85-104.

Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil Suppl*. 1995; 49:321-333.

Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl*. 1997; 51:3-23.

Monniaux D, Mariana JC, Cognie Y, Rabahi F, Monget P, Mermillod P, Baril G, Tomanek M, Pisselet C, Chupin D, et al. Control of terminal follicular maturation during the follicular phase in domestic mammals. *Contracept Fertil Sex*. 1993; 21(5):403-407.

Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19:91-118.

Murphy BD. Models of luteinization. *Biol Reprod*. 2000; 63(1):2-11.

Ndiaye K, Fayad T, Silversides DW, Sirois J, Lussier JG. Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod*. 2005; 73(2):324-333.

Neilson L, Andalibi A, Kang D, Coutifaris C, Strauss JF 3rd, Stanton JA, Green DP. Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics*. 2000; 63(1):13-24.

Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K. Defective

propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(18):9565-9570.

Neuss M, Crow MT, Chesley A, Lakatta EG. Apoptosis in cardiac disease--what is it--how does it occur. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001; 15(6):507-523.

Nimpf J, Schneider WJ. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1529(1-3):287-98.

Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, Flechon JE. Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev*. 2000; 57(1):60-66.

Pangas SA, Matzuk MM. Genetic model for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 225(1-2):83-91.

Park PW, Reizes O, Bernfield M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J Biol Chem*. 2000; 275(39):29923-29926.

Pate JL. Cellular components involved in luteolysis. *J Anim Sci*. 1994; 72(7):1884-1890.

Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev*. 1997; 18(3):281-305.

Perks CM, Peters AR, Wathes DC. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*. 1999; 116(1):157-165.

Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(14):5268-5273.

Pitman JL, Lin TP, Kleeman JE, Erickson GF, MacLeod CL. Normal reproductive and macrophage function in Pem homeobox gene-deficient mice. *Dev Biol*. 1998; 202(2):196-214.

Porter DA, Harman RM, Cowan RG, Quirk SM. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction*. 2001; 121(4):561-566.

- Pramatarova A, Ochalski PG, Chen K, Gropman A, Myers S, Min KT, Howell BW. Nck beta interacts with tyrosine-phosphorylated disabled 1 and redistributes in Reelin-stimulated neurons. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(20):7210-21.
- Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem.* 2001; 276(35):32889-32895.
- Pangas SA, Matzuk MM. Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 225(1-2):83-91.
- Rajamahendran R, Taylor C. Follicular dynamics and temporal relationships among body temperature, oestrus, the surge of luteinizing hormone and ovulation in Holstein heifers treated with norgestomet. *J Reprod Fertil.* 1991; 92(2):461-467.
- Rajkovic A, Yan M S C, Klysik M, Matzuk M. Discovery of germ cell-specific transcripts by expressed sequence tag database analysis. *Fertil Steril.* 2001; 76(3):550-554.
- Reed KE, Westphale EM, Larson DM, Wang HZ, Veenstra RD, Beyer EC. Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein. *J Clin Invest.* 1993; 91(3):997-1004.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* 2002a; 64:69-92.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res.* 2002b; 57:195-220.
- Roberts AJ, Skinner MK. Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology.* 1991; 129(4):2041-2048.
- Roberts AJ, Skinner MK. Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: thecal cell-granulosa cell interactions. *Endocrinology.* 1990; 127(6):2918-2929.
- Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction.* 2003; 125(3):437-446.

Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG, de Kretser DM. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 149(2):744-749.

Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MT, Burger HG, Wettenhall RE, de Kretser DM. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; 126(1):220-226.

Roberts RM, Klemann SW, Leaman DW, Bixby JA, Cross JC, Farin CE, Imakawa K, Hansen TR. The polypeptides and genes for ovine and bovine trophoblast protein-1. *J Reprod Fertil Suppl.* 1991; 43:3-12.

Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(9):4689-4694.

Roche JF. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev Reprod.* 1996; 1(1):19-27.

Rodgers RJ, van Wezel IL, Irving-Rodgers HF, Lavranos TC, Irvine CM, Krupa M. Roles of extracellular matrix in follicular development. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999; 54:343-352.

Rüsse I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat.* 1983; 24:77-92.

Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, Zimmermann DR, Lemire JM, Fischer JW, Wight TN, Clowes AW. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 2001; 276(16):13372-13378.

Saumande J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991; 38(2):189-196.

Sasson R, Rimon E, Dantes A, Cohen T, Shinder V, Land-Bracha A, Amsterdam A. Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10(5):299-311.

Sasson R, Winder N, Kees S, Amsterdam A. Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF alpha and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 294(1):51-59.

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(4):2435-2444.

Schams D, Berisha B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2002; 23(1-2):53-65.

Schmid RS, Jo R, Shelton S, Kreidberg JA, Anton ES. Reelin, integrin and DAB1 interactions during embryonic cerebral cortical development. *Cereb Cortex.* 2005; 15(10):1632-1636.

Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS. Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology.* 1999; 140(6):2733-2744.

Schrewe H, Gendron-Maguire M, Harbison ML, Gridley T. Mice homozygous for a null mutation of activin beta B are viable and fertile. *Mech Dev.* 1994; 47(1):43-51.

Shih DT, Edelman JM, Horwitz AF, Grunwald GB, Buck CA. Structure/function analysis of the integrin beta 1 subunit by epitope mapping. *J Cell Biol.* 1993; 122(6):1361-1371.

Shiota M, Sugai N, Tamura M, Yamaguchi R, Fukushima N, Miyano T, Miyazaki H. Correlation of mitogen-activated protein kinase activities with cell survival and apoptosis in porcine granulosa cells. *Zoolog Sci.* 2003; 20(2):193-201.

Shukovski L, Findlay JK. Activin-A inhibits oxytocin and progesterone production by preovulatory bovine granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 1990; 126(4):2222-2224.

Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature.* 1997; 385(6616):525-529.

Sirois J, Fortune JE. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology.* 1990; 127(2):916-925.

Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 1988; 39(2):308-317.

Sisco B, Hagemann LJ, Shelling AN, Pfeffer PL. Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology.* 2003; 144(9):3904-3913.

Skinner MK, Coffey RJ Jr. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- α by theca cells. *Endocrinology*. 1988; 123(6):2632-1638.

Skinner MK, Osteen KG. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. *Endocrinology*. 1988;123(3):1668-1675.

Slee RB, Hillier SG, Largue P, Harlow CR, Miele G, Clinton M. Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 2001; 142(3):1082-1089.

Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004; 2(1):49-54.

Spicer LJ, Stewart RE. Interaction among bovine somatotropin, insulin, and gonadotropins on steroid production by bovine granulosa and thecal cells. *J Dairy Sci*. 1996; 79(5):813-821.

Spicer LJ, Echtenkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 1995; 12(3):223-245.

Spicer LJ, Alpizar E, Echtenkamp SE. 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*. 1993; 71(5):1232-1241.

Solary E, Plenchette S, Sordet O, Rebe C, Ducoroy P, Filomenko R, Bruey JM, Droin N, Corcos L. Modulation of apoptotic pathways triggered by cytotoxic agents. *Therapie*. 2001; 56(5):511-518.

Solary E. Apoptosis: molecular mechanism. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1998; 192(6):1065-1076.

Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBP β in female reproduction. *Genes Dev*. 1997; 11(17):2153-2162.

Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE, Dawson LJ, Morgan GL, Echtenkamp SE. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. *Endocrinology*. 1996; 137(7):2842-2850.

Strauss JF 3rd, Kallen CB, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Arakane F, Kiriakidou M, Sugawara T. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Prog Horm Res.* 1999; 54:369-395.

Suchyta SP, Sipkovsky S, Kruska R, Jeffers A, McNulty A, Coussens MJ, Tempelman RJ, Halgren RG, Saama PM, Bauman DE, Boisclair YR, Burton JL, Collier RJ, DePeters EJ, Ferris TA, Lucy MC, McGuire MA, Medrano JF, Overton TR, Smith TP, Smith GW, Sonstegard TS, Spain JN, Spiers DE, Yao J, Coussens PM. Development and testing of a high-density cDNA microarray resource for cattle. *Physiol Genomics.* 2003; 15(2):158-164.

Suetsugu S, Tezuka T, Morimura T, Hattori M, Mikoshiba K, Yamamoto T, Takenawa T. Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-WASP and ubiquitination of mDab1. *Biochem J.* 2004; 384(Pt 1):1-8.

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 1994; 101(3):547-555.

Symons M. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci.* 1996; 21(5):178-81.

Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell.* 1996; 84(5):723-34.

Szöllösi D. Maturation de l'ovocyte. In *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. C.Thibault, M-C Levasseur (Eds) Ellipses INRA. 1991; 299-314.

Taft RA, Denegre JM, Pendola FL, Eppig JJ. Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap. *Biol Reprod.* 2002; 67(3):953-960.

Tamura M, Nakagawa Y, Shimizu H, Yamada N, Miyano T, Miyazaki H. Cellular functions of mitogen-activated protein kinases and protein tyrosine phosphatases in ovarian granulosa cells. *J Reprod Dev.* 2004; 50(1):47-55.

Tavares AB, Adashi EY. Differential screening technology in the service of ovarian biology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002; 3(1):13-18.

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell.* 1999; 97(6):689-701.

Uenoyama Y, Okuda K. Regulation of oxytocin receptors in bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 1997; 57(3):569-574.

Uma J, Muraly P, Verma-Kumar S, Medhamurthy R. Determination of onset of apoptosis in granulosa cells of the preovulatory follicles in the bonnet monkey (*Macaca radiata*): correlation with mitogen-activated protein kinase activities. *Biol Reprod.* 2003; 69(4):1379-1387.

Van Wezel IL, Rodgers HF, Rodgers RJ. Differential localization of laminin chains in bovine follicles. *J Reprod Fertil.* 1998; 112(2):267-78.

Van Wezel IL, Dharmarajan AM, Lavranos TC, Rodgers RJ. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology.* 1999; 140(6):2602-2612.

Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, Iruela-Arispe ML. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem.* 1999; 274(33):23349-23357.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995; 270(5235):484-487.

Von Stein OD, Thies WG, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(13):2598-2602.

Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod.* 1992; 47(5):807-813.

Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl.* 2003; 61:71-90.

Wong WY, Richards JS. Evidence for two antigenically distinct molecular weight variants of prostaglandin H synthase in the rat ovary. *Mol Endocrinol.* 1991; 5(9):1269-1279.

Wood JR, Strauss JF 3rd. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002; 3(1):33-46.

Wu B, Iqnotz G, Currie WB, Yang X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1997; 56(1):253-259.

Wylie CC, Heasman J. Migration, proliferation and potency of primordial germ cells. *Semin Dev Biol.* 1993; 4:161-170.

Wylie C. Germ cells. *Cell.* 1999; 96:165-174.

Xiao S, Farnworth PG, Findlay JK. Interaction between activin and follicle-stimulating hormone-suppressing protein/follistatin in the regulation of basal inhibin production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1992; 131(5):2365-2370.

Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod.* 1995; 53(4):951-957.

Yan C, Matzuk MM. Transgenic models of ovarian failure. *J Soc Gynecol Investig.* 2001; 8(1 Suppl Proceedings):S30-33.

Yang M, Sytkowski AJ. Cloning differentially expressed genes by linker capture subtraction. *Anal Biochem.* 1996; 237(1):109-114.

Yao J, Burton JL, Saama P, Sipkovsky S, Coussens PM. Yao J, Burton JL, Saama P, Sipkovsky S, Coussens PM. *Acta Vet Scand.* 2001; 42(3):391-405.

Yeager M, Nicholson BJ. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol.* 1996; 6(2):183-192.

Ying SY, Becker A, Ling N, Ueno N, Guillemin R. Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF beta) have opposite modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 136(3):969-975.

Yoshioka S, Ochsner S, Russell DL, Ujioka T, Fujii S, Richards JS, Espey LL. Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Endocrinology.* 2000; 141(11):4114-4119.

Zeng F, Schultz RM. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biol Reprod.* 2003; 68(1):31-39.

Zeng J, Gorski RA, Hamer D. Differential cDNA cloning by enzymatic degrading subtraction (EDS). *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(21):4381-4385.

Zhao Y, Luck MR. Gene expression and protein distribution of collagen, fibronectin and laminin in bovine follicles and corpora lutea. *J Reprod Fertil.* 1995; 104(1):115-123.

Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol.* 1997; 11(13):1924-1933.

Zhumabayeva B, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD. Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques.* 2001; 30(1):158-163.

