

Université de Montréal

**Étude de l'expression et de la fonction du gène *Ankyrin-repeat and SOCS-Box protein 9 (ASB9)* dans le follicule ovulatoire bovin**

par Gabriel Benoit

Département de biomédecine vétérinaire  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires option biomédecine

Avril 2019

© Gabriel Benoit, 2019

Université de Montréal  
Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire

*Ce mémoire intitulé*

**Étude de l'expression et de la fonction du gène *Ankyrin-repeat and SOCS-Box protein 9*  
(ASB9) dans le follicule ovulatoire bovin**

*Présenté par*  
Gabriel Benoit

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Francis Beaudry**  
Président-rapporteur

**Kalidou Ndiaye**  
Directeur de recherche

**Jacques G. Lussier**  
Codirecteur

**Jean Sirois**  
Membre du jury

## Résumé

La baisse de fertilité chez les vaches laitières est une préoccupation majeure pour l'industrie laitière au Canada car elle entraîne chaque année d'importantes pertes économiques. Cependant, les mécanismes moléculaires associés à une baisse de la fertilité ne sont pas encore complètement élucidés. Dans ce contexte, la régulation du gène *Ankyrin-repeat and SOCS Box protein 9* (ASB9) dans le follicule ovarien a été rapportée pour la première fois par notre laboratoire. Nous avons identifié ASB9 comme un gène différentiellement exprimé dans les cellules de granulosa (CG) de follicules ovulatoires bovins. Toutefois, le rôle biologique d'ASB9 dans les CG était inconnu. Nous avons émis l'hypothèse que l'expression d'ASB9 serait induite par l'hormone lutéinisante (LH) dans les CG et que, par sa fonction biologique, ASB9 contribuerait au contrôle de la fonction des CG. Des CG ont été obtenues à partir de petits follicules (SF : 2-4 mm), de follicules dominants au jour 5 du cycle œstral (DF) et de follicules ovulatoires (OF) 24 heures (h) suivant une injection d'hCG. Des analyses par RT-qPCR et western blot ont démontré une induction de l'expression de l'ARNm et de la protéine ASB9 dans les CG des OF par l'hCG. L'expression d'ASB9 dans les parois folliculaires était significativement induite à partir de 12 h post-hCG, avec une induction maximale 24 h post-hCG ou 24 h suivant la libération endogène de la LH comparée à 0 h. Le criblage d'une banque d'ADNc provenant de follicules ovulatoires à l'aide du système double hybride chez la levure a permis d'identifier 10 protéines partenaires d'ASB9 dont *tumor necrosis factor alpha-induced protein 6* (TNFAIP6), *hypoxia inducible factor 1, alpha subunit* (HIF1A) et cytochrome B (CYTB). L'inhibition d'ASB9 par l'approche CRISPR-Cas9 a entraîné une prolifération des CG et une modulation de l'expression de certains gènes dont celui de l'enzyme stéroïdogénique CYP11A1. Ces résultats confirment un rôle d'ASB9 dans le follicule ovulatoire en contrôlant la prolifération et la fonction des CG, en ciblant des protéines spécifiques susceptibles d'être dégradées et, possiblement, en contribuant à la différenciation finale des CG en cellules lutéales. Les résultats de cette étude pourraient mener à une meilleure compréhension et contrôle de la fonction ovarienne par l'identification de gènes associés à la fertilité chez les vaches laitières.

**Mots-clés :** ASB9, ovaire, cellules de granulosa, follicule ovulatoire, ovulation, LH/hCG, CRISPR-Cas9, vache laitière, fertilité, double hybride.

## Abstract

Dairy cows fertility has been declining steadily worldwide for the last fifty years. This decline in fertility is a major concern for the dairy industry in Canada since it results in significant economic losses each year. Yet, the molecular mechanisms associated with fertility decline are still not fully investigated. In this regard, the regulation of Ankyrin-repeat and SOCS Box protein 9 (ASB9) in the ovarian follicle has been recently reported, for the first time, by our laboratory. We have identified ASB9 as a differentially expressed gene in granulosa cells (GC) of bovine ovulatory follicles. However, the biological role of ASB9 in GC was still unknown. We hypothesized that ASB9 expression would be induced by the luteinizing hormone (LH) in GC and that ASB9 would contribute to the control of GC function. GC were obtained from small follicles (SF: 2-4 mm), dominant follicles at day 5 of the estrous cycle (DF) and ovulatory follicles 24 h post-hCG injection (OF). RT-qPCR and western blot analyzes demonstrated an induction of ASB9 expression in the OF by hCG both at the mRNA and protein levels. Moreover, the expression of ASB9 in follicular walls was significantly induced from 12 h post-hCG and reached a maximum induction 24 h post-hCG or 24 h following the endogenous LH surge as compared to 0 h. Yeast two-hybrid screening of a cDNA library from ovulatory follicles resulted in the identification of 10 ASB9 binding partners, which included tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A) and cytochrome B (CYTB). Inhibition of ASB9 through the CRISPR-Cas9 approach resulted in increased GC proliferation and modulation of target genes expression such as steroidogenic enzyme CYP11A1. These results confirm a physiologically relevant role of ASB9 in the ovulatory follicle by regulating GC proliferation and function, targeting specific proteins that may be degraded and, possibly by contributing to the final differentiation of GC into luteal cells. The results of this study could lead to a better understanding and control of the ovarian function by identifying target genes associated with fertility in dairy cows.

**Keywords:** ASB9, ovary, granulosa cells, ovulatory follicle, ovulation, LH/hCG, CRISPR-Cas9, dairy cow, fertility, yeast two-hybrid.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures .....	9
Liste des sigles .....	10
Remerciements.....	15
INTRODUCTION .....	16
REVUE DE LITTÉRATURE.....	20
Chapitre 1 – Développement folliculaire et ovulation.....	21
1.1 - Physiologie de l’ovaire au cours du cycle œstral .....	21
1.2 - Développement folliculaire .....	22
1.2.1 - Follicules pré-antraux et antraux .....	22
1.2.2 - Vagues de croissance folliculaire .....	23
1.2.3 - Atrésie folliculaire .....	26
1.3 - Ovulation .....	27
1.3.1 - Cascades d’activation intracellulaire suite à la liaison de la LH à son récepteur ..	28
1.3.2 - Maturation ovocytaire.....	29
1.3.3 - Changements à la paroi folliculaire et lutéinisation .....	31
1.3.4 - Modification de l’expression génique dans les CG par la LH.....	32
Chapitre 2 – ASB9 .....	34
2.0 - Ankyrin SOCS-box protein 9 .....	34
2.1 - Les boîtes SOCS.....	34
2.1.1 - Les protéines SOCS et la suppression du signal des cytokines.....	34
2.1.2 - Le fonctionnement des protéines SOCS .....	35
2.1.3 - Le rôle des boîtes SOCS.....	40
2.1.4 - Mécanisme de l’ubiquitination par les boîtes SOCS .....	41
2.2 - Les protéines ASB .....	44
2.2.1 - Les protéines ASB5, ASB11, ASB13 .....	49

2.2.2 - La protéine ASB9 .....	52
PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE, OBJECTIFS ET MODÈLES D'ÉTUDE.....	57
1 - Problématique et hypothèse.....	58
2 - Objectifs.....	59
3 - Modèle d'étude et techniques d'analyse employées.....	60
3.1 - Modèle animal et sélection des groupes de follicules .....	60
3.2 - Description de la méthode double hybride dans les levures.....	61
3.3 - Études fonctionnelles d'ASB9 dans les cellules de granulosa par l'application de la technologie CRISPR/Cas9 .....	62
ARTICLE.....	64
Abstract.....	66
Introduction.....	67
Materials and Methods.....	69
Cloning and characterization of ASB9 .....	69
Experimental animal model and sample preparations .....	69
mRNA expression analysis.....	70
Cell extracts and immunoblotting analysis .....	71
Yeast two-hybrid assay .....	71
Regulation of ASB9 partners during follicular development .....	73
Functional studies using CRISPR/Cas9 experiments .....	73
Statistical analyses .....	74
Results.....	75
ASB9 expression in granulosa cells is induced by hCG/LH .....	75
Yeast two-hybrid (Y2H) screening revealed potential ASB9 partners in granulosa cells .....	75
ASB9 physically interacts with TNFAIP6 and HIF1A.....	78
ASB9 partners are differentially regulated during follicular development .....	78
Functional studies using CRISPR-Cas9.....	79
Discussion.....	80
Conclusion .....	84
References.....	85
Figures Legends .....	94

Supporting information.....	104
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	107
1 - Résumé et pertinence des résultats .....	108
1.1-Analyse de l'expression de l'ARNm et de la protéine ASB9 dans les CG (SF, DF, OF), le CL et les dans les extraits de paroi folliculaires.....	108
1.2- Identification des protéines interagissant avec ASB9 dans les CG du OF et comparaison de leur expression génique (ARNm) dans les CG (SF, DF, OF) et le CL.	108
1.3 - Effet <i>in vitro</i> d'ASB9 sur la prolifération de CG bovine .....	112
2 – Implication des résultats .....	113
3- Limitations et perspectives .....	117
CONCLUSION.....	119
BIBLIOGRAPHIE .....	121
ANNEXE .....	142
Comparaisons de l'expression des gènes de la famille des ASB, 1 à 18, dans les divers groupes de follicules et de corps jaune. ....	143

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Expression différentielle des ARNm exprimés en fonction du stade de développement lors des vagues folliculaires du cycle œstral. ....	25
<b>Tableau II.</b> Membres de la famille des gènes ASB chez l'espèce bovine. ....	47
<b>Tableau III.</b> Analyse par ARN-Seq de l'expression différentielle en ARNm des différents membres de la famille des ASB 1 à 18 lorsque l'expression des ASB du groupe OF (n = 4) est comparée au groupe DF (n = 4). ....	147



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	Vagues de croissance folliculaire chez la vache .....	24
<b>Figure 2.</b>	Représentation des divers compartiments du follicule lors de l'ovulation. ....	28
<b>Figure 3.</b>	Principales étapes d'activation du récepteur JAK-STAT. ....	36
<b>Figure 4.</b>	Illustration des trois modes de fonctionnement des protéines SOCS afin d'inhiber le signal de transduction JAK-STAT du récepteur transmembranaire. ....	38
<b>Figure 5.</b>	Représentation de la formation du complexe ligase E3.....	42
<b>Figure 6.</b>	Représentation des diverses familles de protéines à boîtes SOCS. ....	43
<b>Figure 7.</b>	Formation des divers complexes protéiques de ligase d'ubiquitine E3.....	45
<b>Figure 8.</b>	Représentation phylogénique des protéines ASB chez l'espèce bovine.....	48
<b>Figure 9.</b>	Représentation de la localisation chromosomique d'ASB9 et ASB11 sur le chromosome X bovin.....	48
<b>Figure 10.</b>	Les différentes formes de créatines kinases.....	54
<b>Figure 11.</b>	Réaction catalysée par la créatine kinase.....	55
<b>Figure 12.</b>	Méthode double-hybride dans les levures - Activation des gènes rapporteurs. ....	62
<b>Figure 13.</b>	Fonctionnement d'un ARN guide simple dans le système CRISPR/Cas9 .....	63
<b>Figure 14.</b>	Comparaison par ARN-Seq de l'expression différentielle des différents membres de la famille des ASB .....	144

## Liste des sigles

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

aa : Acides aminés

AD : Domaine d'activation

ADAM : *A disintegrin and metalloproteinase*

ADAMTS : *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondine motifs*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADP : Adénosine biphosphate

AMP : Adénosine monophosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ADN : Acide ribonucléique

ADNm : Acide ribonucléique messenger

AREG : amphiréguline

ATP : Adénosine triphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNgs : Acide ribonucléique guide simple

ARN-Seq : Séquençage de l'ARN

ASB : *Ankyrin repeat and SOCS box containing protein*

ASB9 : *Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 9*

BAX : *BCL2 associated X protein* (protéine pro-apoptotique)

BD : Domaine de liaison

BID : *BH3 interacting domain death agonist* (protéine pro-apoptotique)

BTC : Betacelluline

C (-terminale) : Terminaison amine

Cas9: *CRISPR associated protein 9*

Caspase : *CysteinyI aspartate-specific proteinase*  
CG : Cellules de granulosa  
CIS : *Cytokine-inducible SH2 protein*  
CL : *Corpus luteum* (corps jaune)  
COC: Complexe des cellules du cumulus et de l'ovocyte  
CRL : *Cullin-RING E3 ligase*  
CUL5 : Culline 5  
CKB : Créatine kinase de type B  
CKM : Créatine kinase de type M  
CKM : Créatine kinase de type MB  
CKMt1 : Créatine kinase mitochondriale ubiquitaire  
CKMt2 : Créatine kinase mitochondriale sarcomérique  
CREB : *cAMP responsive element binding protein 1*  
CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*  
CYP11A1 : Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (Cytochrome P<sub>450</sub>)  
CYTB : Cytochrome B  
C/EBP $\alpha/\beta$  : *CCAAT enhancer binding protein alpha et beta*  
DF : Follicule dominant au jour 5 du cycle œstral  
E2: Oestradiol-17 $\beta$   
ECS : *Élongine BC – Culline – SOCS box*  
EDN2: Endothéline 2  
EGF : *Epidermal Growth Factor*  
EREG : Épiréguline  
ERK 1\2 : *Extracellular regulated kinase 1\2*  
FGF2 : *fibroblast growth factor 2*  
FOS: *Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*  
FOXO3A: *Forkhead box O3A*  
FSH : Hormone folliculo-stimulante  
GAL4: *Galactose-responsive transcription factor GAL4*  
GJA1 : *Gap junction protein alpha 1*

GJA4 : *Gap junction protein alpha 4*  
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
GnRH : Hormone de libération des gonadotrophines  
h : heures  
hCG : Hormone chorionique gonadotrope humaine  
HAS2 : Hyaluronane synthase 2  
HECT : *Homologous to E6-associated protein carboxyl terminus*  
HIF1 $\alpha$  : *Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*  
I $\alpha$ I : *Serum-derived inter alpha-inhibitor*  
IBD : *Inflammatory bowel diseases*  
IGF1 : *Insuline-like growth factor 1*  
J : Jour  
JAB : *JAK2 binding protein*  
JAK : *Janus kinase*  
JUN : *Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*  
kDa : Kilo Dalton  
KIR : *Kinase inhibitory region*  
KITLG : *KIT ligand*  
LH : Hormone lutéinisante  
LHCGR : Récepteurs à l'hormone lutéinisante  
MMPs : Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire  
N (-terminale) : terminaison carboxyle  
OF : Ovulatory follicle  
P4 : Progestérone  
pb : Paires de bases  
PCR : Réaction en chaîne par polymérase  
PDE3A : Phosphodiesterase 3A  
PGE2 : Prostaglandine E<sub>2</sub>  
PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F<sub>2 $\alpha$</sub>   
PGR : Récepteur à la progestérone  
PKA : Protéine kinase A (dépendante de l'AMPc)

PKC : Protéine kinase C  
PLA2G4A : Phospholipase A2  
PLAT : plasminogen activator, tissue type  
PTGES : *Prostaglandin E synthase*  
PTGS2 : *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*  
PTX3 : Pentraxine 3  
qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative  
RBX1 : *RING box protein 1*  
RBX2 : *RING box protein 2*  
RING : *Really interesting new gene*  
RT : Transcriptase inverse  
SF : Petits follicules  
sgRNA : *single guide RNA*  
SH2 : *Scr homology 2*  
SOCS : *Suppressor of cytokine signaling*  
SSB : *SPRY-domain proteine with a SOCS box*  
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*  
TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinases*  
TIMP1: *TIMP metalloproteinase inhibitor 1*  
TIMP2: *TIMP metalloproteinase inhibitor 2*  
TNFAIP6 : *Tumor necrosis factor alpha-induced protein 6*  
uMtCK :Créatine kinase mitochondriale ubiquitaire  
VEGF: *Vascular endothelial growth factor*  
VHL : *Suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau*  
WSB : *WD40 repeat protein with a SOCS box*  
Y : Tyrosine  
Y2H : Double hybride dans les levures

*À Rosaire, parrain et grand-père extraordinaire.  
Peu importe où tu es, j'espère que la vie là-bas est aussi drôle qu'ici.*

## Remerciements

Je tiens à présenter mes premiers et plus sincères remerciements à mes directeurs de recherche, Dr Kalidou Ndiaye et Dr Jacques G. Lussier. Dr Ndiaye, pour sa délicatesse, sa rigueur, sa motivation et ses encouragements continus. Dr Ndiaye est un pédagogue hors pair qui a su me guider autant sur le plan technique que théorique. Toujours disponible et compréhensif, il a été le directeur de recherche idéal. Dr Lussier, pour son enthousiasme, sa clairvoyance et sa sagacité. Dr Lussier est à la fois rigoureux et doux, sa passion pour la connaissance est contagieuse. Pour leur patience, leur dévouement et leur confiance, je leur dois mon succès.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel de mon laboratoire, notamment le Dr David W. Silversides pour ses judicieux conseils et sa bonne humeur communicative, ainsi que Manon Salvas, Isabelle Daneau et Sonia Bernier pour leur soutien constant. Un merci particulier à mon collègue Aly Warma pour sa collaboration dans les expérimentations.

Pour terminer, un merci tout spécial à ma famille et mes amis pour leur accompagnement tout au long de mes études. Sans leur soutien moral indéfectible, un tel projet n'aurait pu être possible.

# **INTRODUCTION**



Chez la vache, tout au long de la période post-puberté, l'appareil génital subit des modifications morphologiques et physiologiques périodiques définissant le cycle œstral. Ces modifications dépendent de l'action de diverses hormones produites par l'ovaire sous le contrôle des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et sont normalement interrompues par la gestation. L'ovaire exerce une fonction exocrine ou gamétogénique et une fonction endocrine qui sont toutes deux étroitement liées à l'évolution d'une même unité morphologique qui est le follicule ovarien.

Les follicules ovariens se développent et ovulent de façon périodique pour libérer un ovocyte et former le corps jaune. Le follicule ovarien progresse ainsi à travers diverses étapes de développement allant du stade de follicule primordial au stade de follicule ovulatoire d'où sera libéré l'ovocyte au moment de l'ovulation. Toutefois, la majorité des follicules n'atteignent pas le stade ovulatoire et subissent l'atrésie durant les stades préantral et antral précoces (Tilly 1996, Knight and Glistler 2001). Ainsi, les follicules amorcent leur croissance à partir de la réserve des follicules primordiaux et poursuivent une phase de croissance indépendante des hormones gonadotropes représentée par le stade folliculaire non-antral. Les follicules acquièrent un antra à environ 0,2 mm de diamètre chez la vache et au stade antral d'environ 3 à 4 mm de diamètre, plusieurs follicules sont recrutés de façon périodique sous l'influence d'une augmentation de la concentration sanguine de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Ginther, Beg et al. 2001, Rawlings, Evans et al. 2003, Fortune, Rivera et al. 2004, Son, Das et al. 2011, Ginther 2016, Ginther, Dangudubiyam et al. 2019). Suite à la phase de recrutement folliculaire, un seul follicule est sélectionné afin de poursuivre son développement et est identifié comme étant le follicule dominant. Les follicules non sélectionnés ou subalternes dégèrent donc par atrésie (Markstrom, Svensson et al. 2002).

La phase de recrutement des follicules survient périodiquement deux à trois fois dans un cycle œstral de 21 jours en moyenne (Roche 1996, Fortune, Cushman et al. 2000, Ginther, Bergfelt et al. 2001). Les variations périodiques des concentrations de FSH au cours du cycle œstral, responsables du recrutement des follicules de diamètre supérieur à 3 mm, sont contrôlées par l'augmentation des concentrations d'œstradiol-17 $\beta$  (E2) et d'inhibine sécrétées par le follicule dominant. Selon le temps du cycle œstral, le follicule dominant ovulera libérant l'ovocyte ou dégèrera par atrésie (Markstrom, Svensson et al. 2002, Richards, Russell et al.

2002). Au cours de la croissance des follicules au-delà de 5-6 mm, les CG du follicule sélectionné acquièrent des récepteurs à l'hormone lutéinisante (LHCGR) (McFarland, Sprengel et al. 1989) permettant ainsi de transférer sa dépendance vis-à-vis de la FSH vers l'hormone lutéinisante (LH) et de mécanismes locaux impliquant, entre autres, l'activine et l'*Insuline-like growth factor* 1 (IGF1) (Mihm and Evans 2008, Ginther 2016, Ginther, Dangubiyyam et al. 2019). Les fortes concentrations d'E2, en l'absence de progestérone (P4), stimulent la libération de la *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) entraînant la relâche préovulatoire de LH, signal qui déclenche l'ovulation du follicule. Tous ces processus de développement du follicule ovarien ainsi que le processus d'ovulation constituent des phénomènes d'importance qui permettent la formation du gamète femelle assurant le maintien de l'espèce.

Il est bien documenté que l'activité ovarienne cyclique entraîne de profondes modifications nécessitant une coordination spatio-temporelle de la prolifération, de l'apoptose et de la différenciation de divers types cellulaires dans le follicule ovarien, entraînant des modifications de l'expression génique (Knight and Glister 2001, Rosenfeld, Wagner et al. 2001, Eppig, Wigglesworth et al. 2002, Ndiaye, Fayad et al. 2005). Au cours des processus de croissance folliculaire et d'ovulation, les cellules stéroïdogènes, notamment les CG, jouent un rôle crucial dans la maturation et la libération de l'ovocyte. Les CG sont une composante particulièrement importante du follicule, car elles jouent un rôle essentiel dans les fonctions de reproduction en contribuant à la synthèse des hormones stéroïdiennes (Knight and Glister 2001), à la maturation de l'ovocyte (Eppig, Wigglesworth et al. 2002) et à la formation du corps jaune après l'ovulation (Rosenfeld, Wagner et al. 2001, Richards and Ascoli 2018). Le contrôle de la prolifération et de la fonction des CG est donc complexe et dépend de la régulation et de l'activation précises de gènes cibles spécifiques. Cette régulation est essentielle au développement normal du follicule, à la production rapide de facteurs paracrines et elle affecte l'état physiologique du follicule ovulatoire. Par exemple, la transcription de gènes spécifiques qui contrôlent la croissance d'un follicule dominant bovin est rapidement inhibée dans les CG suite à une augmentation de la signalisation intracellulaire médiée par la LH (Ndiaye, Fayad et al. 2005, Ndiaye, Carriere et al. 2015), tandis que la LH contrôle ou induit l'expression de gènes impliqués dans l'ovulation et la lutéinisation (Lussier, Diouf et al. 2017). Ces observations

démontrent l'importance des études fonctionnelles des gènes au cours des dernières étapes du développement folliculaire et de l'ovulation afin de mieux coordonner l'activité ovarienne.

Bien que la séquence des événements morphologiques du développement folliculaire et de l'ovulation soit bien connue depuis plusieurs années, ce n'est que plus récemment que l'identification des différents gènes intervenant dans ces processus a commencé à être élucidée et leurs rôles définis. Dans ce contexte, l'expression du gène codant pour la protéine *Ankyrin-repeat and SOCS Box protein 9* (ASB9) dans le follicule ovarien lors de l'ovulation a été rapportée pour la première fois par notre laboratoire (Lussier, Diouf et al. 2017). Cependant, le rôle biologique d'ASB9 dans le contrôle de la prolifération et la fonction des CG était inconnu, ce qui a motivé les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire. Le premier chapitre de ce mémoire aborde donc brièvement le développement folliculaire et l'ovulation chez la vache. En deuxième lieu, une revue approfondie de nos connaissances sur les fonctions associées à la grande famille des protéines contenant une boîte SOCS est présentée. La sous-famille des protéines SOCS à domaine ankyrine dont ASB9 fait partie présente un intérêt particulier dans le cadre de nos objectifs et notre hypothèse de recherche.

# REVUE DE LITTÉRATURE

# Chapitre 1 – Développement folliculaire et ovulation

## 1.1 - Physiologie de l'ovaire au cours du cycle œstral

Chez la vache, le **cycle œstral** se déroule sur une période de 18 à 24 jours, en moyenne 21 jours. Au cours du cycle œstral, on observe une phase lutéale caractérisée par la présence d'un corps jaune (CL), occupant 80% du temps du cycle, suivie d'une phase folliculaire de courte durée qui débute avant la régression du CL (Hansel and Convey 1983, Roche 1996). La période de chaleur ou l'œstrus, désigne le jour 0 (J0) du cycle et dure de 12 à 16 h. L'ovulation survient environ 10 à 12 h suite à l'œstrus (Rajamahendran and Taylor 1991), soit vers 30 h suivant la relâche préovulatoire de l'hormone lutéinisante (LH) qui origine de l'hypophyse (Sirois and Dore 1997).

La **phase lutéale** débute suite à l'ovulation lorsque le follicule ovulatoire se transforme en CL et est responsable de la sécrétion de la progestérone (P4). Vers le jour 18 du cycle oestral, le CL régresse sous l'effet des prostaglandines (PGF2 $\alpha$ ) d'origine utérine, ce qui entraîne une diminution des concentrations plasmatiques de la P4 de 9 ng/ml en deçà de 1 ng/ml, marquant ainsi la fin de la phase lutéale et le début de la phase folliculaire (Hansel and Convey 1983). La **phase folliculaire** est caractérisée par un recrutement de follicules antraux  $\geq 4$  mm de diamètre, suivi d'une phase de sélection de laquelle un seul follicule dominant ou préovulatoire sera sélectionné (Roche 1996, Ginther, Beg et al. 2001, Mihm, Crowe et al. 2002, Mihm and Evans 2008, Ginther 2016). À la fin du cycle œstral et faisant suite à la lutéolyse, le follicule dominant ou préovulatoire en croissance présente une activité élevée de l'aromatase responsable des concentrations plasmatiques élevées d'œstradiol-17 $\beta$  (E2). Lorsque les concentrations plasmatiques de E2 sont suffisamment élevées et en présence de faibles concentrations de P4, ceci déclenche le comportement de chaleur et une stimulation de la relâche préovulatoire de LH hypophysaire provoquant l'ovulation du follicule préovulatoire.

## **1.2 - Développement folliculaire**

### **1.2.1 - Follicules pré-antraux et antraux**

La folliculogénèse se définit comme étant l'ensemble du processus de croissance des follicules. Au stade initial de croissance, les follicules primordiaux sont constitués d'un ovocyte entouré de quelques cellules de granulosa (CG) immatures. Ils représentent la population folliculaire la plus nombreuse de l'ovaire dont le nombre est estimé à la naissance entre 40 000 à 800 000 (Erickson 1966). Leur nombre est établi au cours du développement foetal et forme la réserve de follicules non-proliférant à partir de laquelle ils amorceront leur croissance tout au cours de la vie reproductive de l'animal (Cahill and Mauleon 1981). Cette réserve diminuera au cours de la vie de l'animal au fur et à mesure qu'ils débiteront leur croissance. Les mécanismes permettant le recrutement des follicules primordiaux à partir de la réserve vers la phase de croissance sont encore incompris, mais feraient intervenir l'expression du gène FOXO3A par l'ovocyte (Castrillon, Miao et al. 2003, Hosaka, Biggs et al. 2004) et le contrôle de son ton taux de phosphorylation par les signaux de KITLG provenant des CG (Thomas and Vanderhyden 2006). Suivant son recrutement, le follicule débute une croissance lente et fait partie du pool des follicules non-antraux. Lorsqu'un follicule primordial amorce sa croissance, celle-ci se poursuit de façon continue vers le stade de follicule primaire, secondaire puis tertiaire.

Le follicule augmente de diamètre grâce à l'augmentation du diamètre de l'ovocyte, de l'apparition de la zone pellucide, de la multiplication des CG et du développement des cellules de la thèque entourant le follicule, formant les follicules secondaires. Les cavités se formant au pourtour des CG se fusionnent puis vers 0,2 mm de diamètre, lorsque le follicule est considéré étant au stade tertiaire, les cavités forment l'antra folliculaire contenant le liquide folliculaire (Lussier, Matton et al. 1987, Rodgers and Irving-Rodgers 2010). Le liquide folliculaire est formé d'un transsudat du plasma et des sécrétions des CG. La concentration des différentes composantes du liquide folliculaire varie selon le stade de croissance du follicule et selon le moment du cycle (Ireland and Roche 1982, Ireland and Roche 1983). Le développement folliculaire est en continu chez les follicules pré-antraux et antraux jusqu'à environ 4 mm de diamètre, puis s'observe par vagues au-delà de 4 mm jusqu'à l'ovulation vers 13 à 15 mm.

## 1.2.2 - Vagues de croissance folliculaire

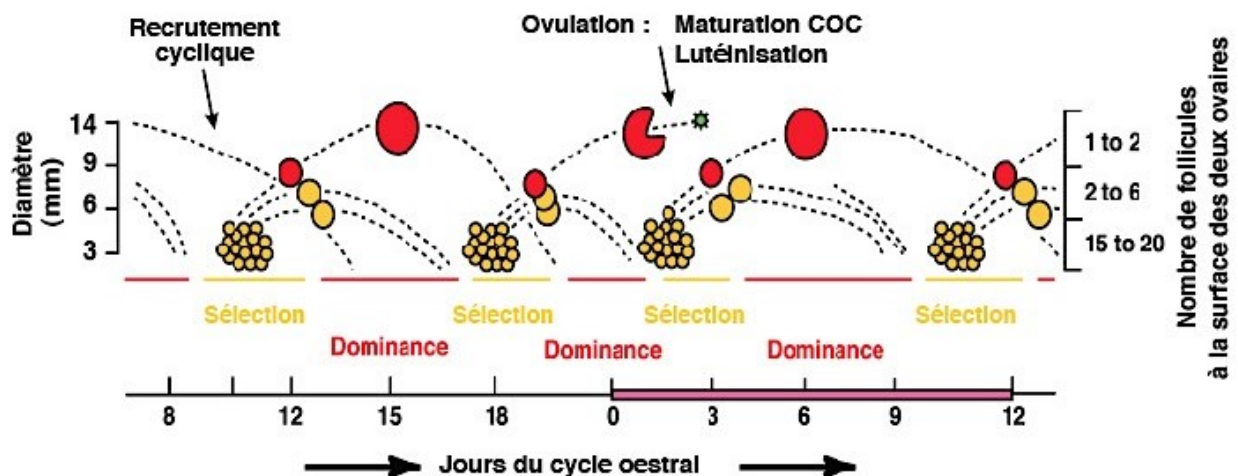
Chez l'espèce bovine, on observe deux à trois **vagues de croissance folliculaire** au cours du cycle œstral (Sirois and Fortune 1988, Roche 1996, Ginther, Beg et al. 2001, Mihm, Crowe et al. 2002, Mihm and Evans 2008). La majorité des vaches présentent deux vagues. Ces vagues de développement folliculaire se présentent comme des périodes de croissance et de régression d'un groupe de 5 à 10 follicules de diamètres  $\geq 4$  mm. Chaque vague folliculaire est caractérisée par une période de recrutement, de sélection et de dominance.

Au début du cycle œstral (J1-2), une augmentation transitoire de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) stimule le **recrutement folliculaire** par l'entrée en croissance de 5 à 10 follicules au-delà de 4 mm de diamètre (**Figure 1**) (Fortune 1994, Lussier, Matton et al. 1994, Gong, Campbell et al. 1996, Fortune, Rivera et al. 2001). Au stade de 4 mm, les follicules deviennent plus dépendants des hormones gonadotropes, initialement de la FSH de 4 à 8 mm et de la LH vers 8 mm. Si l'augmentation de la FSH est inhibée ou retardée, le recrutement sera aussi inhibé ou retardé (Fortune 1994, Lussier, Matton et al. 1994).

La **sélection folliculaire** (J3-4) permet à un seul follicule de poursuivre son développement tandis que les follicules subalternes dégèrent par atrophie (**Figure 1**) (Roche 1996, Mihm and Evans 2008). La croissance des follicules favorise la sécrétion d'inhibine qui occasionne une baisse de la FSH sanguine (Ginther 2016) diminuant le support hormonal aux follicules en croissance. Au cours de cette phase, un seul follicule ayant acquis les caractéristiques requises pour croître dans un environnement avec une concentration faible de FSH pourra poursuivre son développement. En outre, la sécrétion d'E2, la présence de mécanismes locaux paracrines tel que l'activine, la présence d'IGF1 et la variation de l'expression des protéines de liaison de l'IGF1 permettent d'augmenter la sensibilité à la diminution de la concentration sanguine en FSH (Spicer and Echternkamp 1995). De plus, l'expression de récepteurs à la LH par les CG vers 8 mm permet de soutenir son développement sous l'action de la LH dans un environnement en faible concentration de FSH (Ginther 2016).

Faisant suite à la sélection, la **phase de dominance** s'amorce où le follicule dominant poursuit sa croissance au-delà de 8 mm pour atteindre de 12 à 15 mm de diamètre (**Figure 1**) (Roche 1996, Mihm, Crowe et al. 2002, Mihm and Evans 2008, Ginther 2016). La croissance

du premier follicule dominant du cycle ralentit vers le jour 7-8 du cycle œstral parallèlement à une diminution de la synthèse d'E2, dûe à la présence du CL qui sécrète de la P4 ayant pour effet de diminuer la relâche de la LH hypophysaire (Evans and Fortune 1997). La perte de la dominance entre les jours 7 et 9 favorise une nouvelle augmentation transitoire de FSH sanguine qui stimule l'émergence d'une nouvelle phase de recrutement de follicules d'environ 4 mm de diamètre. Ce recrutement est suivi de la sélection d'un nouveau follicule dominant tandis que le follicule dominant de la précédente vague folliculaire régresse. Si la régression lutéale se produit au cours de la période de dominance du second follicule dominant, celui-ci ovulera (**Figure 1**). Toutefois, si le CL est toujours actif, le second follicule dominant deviendra atésique et sera suivi d'une troisième vague folliculaire d'où sera issu le troisième follicule dominant qui s'acheminera vers l'ovulation.



**Figure 1.** Vagues de croissance folliculaire chez la vache

*Illustration d'un cycle œstral à trois vagues folliculaires chez la vache. Dans chaque vague folliculaire, la FSH permet le recrutement d'un ensemble de follicules antraux. De ce groupe, il y aura sélection de follicules, dont généralement un seul pourra atteindre la dominance. Pendant les deux premières vagues, en présence d'un corps jaune, les follicules sélectionnés subiront l'atrésie. Lors de la troisième vague, suite à la lutéolyse, le follicule dominant pourra ovuler. Adapté de (Roche 1996)*



Chez la vache, afin de permettre de mieux comprendre les mécanismes de croissance et de sélection folliculaire, plusieurs études ont rapporté une variation de l'expression des ARNm dans les CG et/ou de la thèque et plus récemment des micro-ARN. ARNm : (Bedard, Brule et al. 2003, Sisco, Hagemann et al. 2003, Fayad, Levesque et al. 2004, Ndiaye, Fayad et al. 2005, Douville and Sirard 2014, Hatzirodos, Hummitzsch et al. 2014, Hatzirodos, Irving-Rodgers et al. 2014, Girard, Dufort et al. 2015, Hatzirodos, Hummitzsch et al. 2015, Khan, Landry et al. 2016, Li, Meng et al. 2016, Zielak-Steciwo and Evans 2016, Dias, Khan et al. 2018). Micro-ARN : (Salilew-Wondim, Ahmad et al. 2014, Zielak-Steciwo, Browne et al. 2014, Gebremedhn, Salilew-Wondim et al. 2015). Ces études ont permis de répertorier les gènes exprimés à la hausse ou induits dans les CG ou de la thèque de follicules sélectionnés ou dominants comparativement aux plus petits follicules non-sélectionnés. Les différents modèles d'étude utilisés ainsi que la variété des techniques utilisées dépassent le simple cadre de ce mémoire afin d'extraire une liste détaillée des gènes démontrant une expression différentielle dans les CG et de la thèque selon le stade de développement. Toutefois, on retrouve dans la majorité de ces études, des résultats qui confirment les observations des années qui précèdent la disponibilité des techniques d'analyses transcriptionnelles. Une liste se résumant à quelques gènes les plus évidents et identifiés par différents auteurs se retrouve dans le **Tableau I**.

**Tableau I.** Expression différentielle des ARNm exprimés en fonction du stade de développement lors des vagues folliculaires du cycle œstral.

Follicle stage	Gene symbol
Recruitment	<i>CYP19, TBC1D1</i> <i>CYP19</i>
Selection	<i>CYP19, INHBA, ApoER2, MAPKK5, CPD</i> <i>FSHR, ESR2, INHA, ACVR1, CCND2, LHCGR,</i> <i>TIAF1, LASS4</i>
Dominance	<i>CYP19, TBC1D1</i> <i>CYP19, LHCGR, ERβ, DICE-1, MCL-1,</i> <i>CYP19, TBC1D1</i> <i>CYP19, CEBP-β, SRF</i>
Atresia	<i>CTNNA, HGF, IL-6, TGFB1, TYRO3, JAM2</i> <i>TGFBRIII, COX-1, TNFα, CAD, DRAK-2, CASP-13, P58(IPK), Apaf-1, BTG-3, TS-BCLL,</i> <i>Siva, FADD, TNFSF8</i> <i>FKHRL1, NCOR1, MIDN, STX7, SPC22, EHD3</i>

Tiré de : (Zielak-Steciwo and Evans 2016)

### 1.2.3 - Atrésie folliculaire

L'atrésie est le processus dégénératif qui met fin à la croissance du follicule et par lequel ce dernier perd son intégrité morphologique, ses propriétés physiologiques et ses capacités biochimiques. C'est la destinée de la majorité des follicules qui ont amorcé leur croissance, soit plus de 99% des follicules (Lussier, Matton et al. 1987, Lussier, Matton et al. 1994). L'atrésie peut survenir à tous les moments de la croissance du follicule et augmente en fonction du diamètre folliculaire, étant par contre rarement observée chez l'animal adulte dans les follicules préantraux comparativement aux follicules antraux (Cahill and Mauleon 1980, Cahill and Mauleon 1981). Chez la vache, il est estimé qu'au début de la formation de l'antra, vers 0,2 mm de diamètre, environ 20% des follicules présentent des signes d'atrésie tandis que de 4 à 8 mm de diamètre, 93% des follicules sont considérés en atrésie (Lussier, Matton et al. 1987, Lussier, Matton et al. 1994). L'atrésie folliculaire est caractérisée initialement au plan morphologique par l'apparition de corps picnotiques qui résultent de la fragmentation et de la condensation de la chromatine dans les CG, caractéristique du processus d'apoptose cellulaire (Hsueh, Billig et al. 1994, Quirk, Cowan et al. 2004). Suivant l'apparition de corps picnotiques des CG, la couche de CG se détache, la membrane basale séparant les couches de la granulosa et de la thèque se fragmente, suivi d'une hypertrophie des cellules de la thèque et une perte de vascularisation capillaire (Marion, Gier et al. 1968). Au plan fonctionnel, le follicule en début d'atrésie possède une concentration plus élevée en P4 et plus faible en E2 (Ireland and Roche 1983).

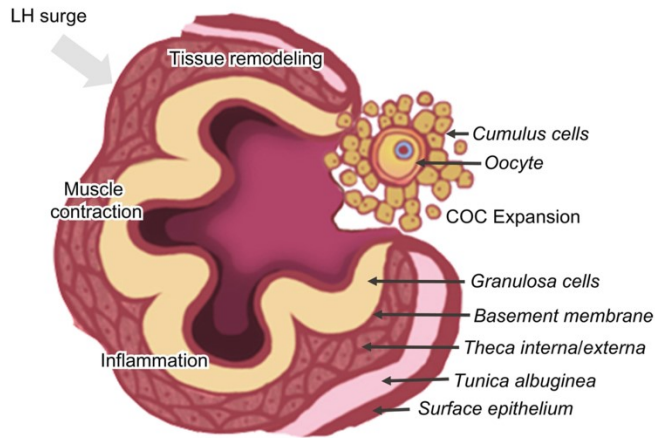
Divers facteurs sont à l'origine de l'initiation du processus d'apoptose. Ces signaux peuvent provenir de l'extérieur ou de l'intérieur de la cellule. La baisse ou le manque de facteurs de croissance tels que la FSH, l'E2 ou l'IGF1 (Quirk, Cowan et al. 2004) ou l'activation de récepteurs membranaires de mort cellulaire (Porter, Harman et al. 2001) stimule les voies de signalisation intracellulaire qui résultent en une activation de diverses caspases 3, 6 et 7 (Hengartner 2000). Les caspases détruisent les protéines impliquées dans la division cellulaire, les protéines de structure et de réparation cellulaire ainsi que les facteurs de transcription et de traduction. De l'intérieur de la cellule, des signaux pro-apoptotiques tel que BAX et BID induisent la perte du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol qui à son tour stimule l'activité de la caspase 9 (Manabe, Goto et al. 2004, Quirk, Cowan et al. 2004). Chez la vache, l'expression génique entre des follicules fortement et faiblement œstrogéniques a été comparée

par analyse de micro-réseau (Evans, Ireland et al. 2004). Cette étude rapporte une augmentation de l'expression de onze gènes reconnus comme étant impliqués dans l'apoptose de follicules en début d'atrésie. La comparaison de l'expression génique dans les cellules de la thèque interne de follicules sains et atrésiques a rapporté un nombre élevé de gènes différentiellement exprimés, suggérant que les cellules de la thèque contribuent aussi à l'atrésie folliculaire (Hatzirodos, Irving-Rodgers et al. 2014). De plus, plusieurs études récentes rapportent une expression plus élevée de divers micro-ARN dans les CG de follicules en début d'atrésie. Ces micro-ARN sont impliqués dans le contrôle de diverses voies de signalisation intracellulaire et ces observations contribuent à la complexité grandissante du mécanisme d'apoptose (Zielak-Steciwko and Evans 2016, Zhang, Xu et al. 2019).

### **1.3 - Ovulation**

L'ovulation est le but ultime de la croissance folliculaire qui est atteinte par moins de 0,1% des follicules contenus dans les ovaires. Ce processus permet la libération d'un ovocyte mature du follicule vers l'oviducte pour sa fécondation suivi de la transformation du follicule en CL. Chez la vache, l'ovulation est déclenchée environ 30 h suivant la relâche des hormones gonadotropes (Sirois 1994). Les changements observés dans le follicule et l'ovocyte lors de l'ovulation sont initialement associés à l'augmentation rapide des concentrations de LH. Cette dernière se lie à ses récepteurs membranaires, LHCGR, localisés sur les CG et de la thèque interne, et entraîne une augmentation de la signalisation intracellulaire suivie de modifications de l'expression spatio-temporelle de gènes spécifiques et de l'activation de protéines dans les divers compartiments du follicule tel que les couches cellulaires de la thèque, de la granulosa et du complexe cumulus-ovocyte (Espey and Lipner 1994, Richards and Ascoli 2018, Robker, Hennebold et al. 2018). Entre ces divers compartiments du follicule ovulatoire, divers signaux paracrines et autocrines contribuent aux événements menant à la rupture de la paroi folliculaire. Ces événements incluent un remodelage tissulaire et une réaction inflammatoire aigüe contrôlée ainsi que l'expansion des cellules du cumulus qui marque la maturation finale du complexe des cellules du cumulus et de l'ovocyte. Finalement, on assiste à la différenciation des CG et de la

thèque interne en cellules lutéales, à l'angiogenèse, à la contraction des cellules de la paroi folliculaire afin de déclencher la rupture du follicule et à l'infiltration de cellules immunitaires.



**Figure 2.** Représentation des divers compartiments du follicule lors de l'ovulation.

*Sur la gauche de la figure, sont présentés différents processus observés lors de l'ovulation (pic de LH, remodelage tissulaire, contraction musculaire et inflammation), alors que sur la droite, sont indiquée les principales composantes du follicule ovulatoire (de haut en bas : cellules du cumulus, ovocyte, CG, membrane basale, thèque interne et externe, tunique albuginée et surface épithéliale). Tiré de (Russell and Robker 2019)*

### 1.3.1 - Cascades d'activation intracellulaire suite à la liaison de la LH à son récepteur

Les travaux de recherche axés sur l'expression des gènes différentiellement exprimés lors de l'ovulation et les nombreuses études d'inactivation de gènes spécifiques chez la souris ont permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents au processus de l'ovulation (Richards and Ascoli 2018, Robker, Hennebold et al. 2018). La liaison de la LH à son récepteur, LHCGR, stimule des cascades de signalisation intracellulaire en activant, entre autres, l'adénylate cyclase causant une augmentation importante d'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA) ainsi que la voie des *Extracellular regulated kinase 1\2* (ERK 1\2) et de la protéine kinase C (PKC). À leur tour, les kinases PKA, ERK1\2 et PKC activent

des facteurs de transcription dont les plus importants sont le *cAMP responsive element binding protein 1* (CREB), le *CCAAT enhancer binding protein alpha et beta* (C/EBP $\alpha/\beta$ ), le récepteur à la progestérone (PGR) et la famille des facteurs de transcription liée au *Transcription factor subunit AP-1* tel que JUN et FOS (Richards and Ascoli 2018, Robker, Hennebold et al. 2018). Les actions subséquentes de ces facteurs de transcription dans les CG et de la thèque induisent ou stimulent l'expression spécifique de plusieurs gènes qui contribuent à la maturation du complexe des cellules du cumulus et de l'ovocyte (COC), de la réaction protéolytique associée au remodelage de la paroi folliculaire et de la lutéinisation des CG et de la thèque interne pour former le CL. À titre d'exemple, les souris chez lesquels les facteurs de transcription ERK1 et ERK2 (Fan, Liu et al. 2009) ou C/EBP $\alpha/\beta$  (Fan, Liu et al. 2011) ont été invalidés sont infertiles et démontrent une modification importante de l'expression de plusieurs gènes cibles de ces facteurs de transcription dans les CG.

### **1.3.2 - Maturation ovocytaire**

Sous l'effet de la LH et de l'activation de ses récepteurs, une réaction d'expansion des CG du cumulus entourant l'ovocyte est suivie de la maturation de l'ovocyte. Au cours de la croissance du follicule, du stade primordial au stade pré-ovulatoire, l'ovocyte est arrêté au stade diplotène de la prophase I de la méiose. Ce maintien à ce stade de développement dépend du transfert de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir des CG du cumulus vers l'ovocyte par les jonctions intercellulaires formées spécifiquement par la connexine 36 (Richards and Ascoli 2018). Le GMPc a pour effet d'inhiber la phosphodiesterase 3A (PDE3A) dans l'ovocyte qui est responsable de la formation d'adénosine monophosphate (AMP) nécessaire à la progression de la maturation ovocytaire (Wigglesworth, Lee et al. 2013). Suite à la relâche préovulatoire de LH, la communication entre les CG du cumulus et de l'ovocyte ainsi que les CG de la paroi folliculaire sont rompues ce qui occasionne la levée de l'inhibition de la PDE3A et l'augmentation d'AMP dans l'ovocyte. Ces événements permettent à l'ovocyte de poursuivre sa maturation jusqu'au stade métaphase II tout en relâchant le premier corps polaire. Cette action de la LH est le résultat, d'une part, de la réduction de l'expression du gène *Gap junction protein alpha 4* (GJA4) codant pour la connexine 37 (Winterhager and Kidder 2015) qui est responsable de la formation des jonctions intercellulaires entre les CG du cumulus et de

l'ovocyte et, d'autre part, du gène *Gap junction protein alpha 1* (GJA1) qui code pour la connexine 43 formant les jonctions entre les CG du cumulus et celles de la paroi folliculaire (Ndiaye, Fayad et al. 2005).

Le complexe COC subit une expansion importante de son volume sous l'effet de la LH qui résulte de l'induction de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de diverses protéines de la matrice extracellulaire. Puisque les récepteurs LH ne sont pas ou très peu exprimés par les cellules du cumulus, une signalisation paracrine à partir des CG de la paroi du follicule assure la transmission du signal de la LH des CG murales vers les cellules du cumulus. Divers signaux paracrines sont bien connus dont ceux se liant aux récepteurs EGF localisés aux cellules du cumulus tel que l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG) et la betacelluline (BTC) (Park, Su et al. 2004, Russell and Robker 2007), ainsi que les prostaglandines (Sirois, Sayasith et al. 2004, Choi, Wilson et al. 2017). Les facteurs AREG, EREG et BTC sont des protéines dont l'expression est induite précocement par la LH et elles sont ancrées à la membrane cellulaire des CG par un passage transmembranaire. Ces facteurs sont relâchés de la membrane par l'action de diverses protéases dont l'expression est aussi induite par la LH et correspondent aux familles des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) et des protéases de type désyntégrine sans (ADAM) ou avec motif thrombospondine (ADAMTS) (Shimada, Umehara et al. 2016, Richani and Gilchrist 2018). En lien aux prostaglandines, la LH induit une expression élevée des enzymes impliqués dans la synthèse principalement de prostaglandines E2 qui se lie à son récepteur membranaire localisé au CG. Divers gènes sont induits par la LH dont la phospholipase A2 (PLA2G4A), la *prostaglandin-endoperoxide synthase 2* (PTGS2) et la *prostaglandin E synthase* (PTGES) afin de favoriser la production principalement de prostaglandines E2 (PGE2) qui se lie à son récepteur membranaire localisé aux CG (Sirois, Sayasith et al. 2004, Diouf, Sayasith et al. 2006, Choi, Wilson et al. 2017). Ces signaux, AREG, EREG, BTC et les prostaglandines, induisent l'expression de plusieurs gènes responsables de la synthèse de diverses protéines de la matrice extracellulaire dont la hyaluronane synthase 2 (HAS2), la pentraxine 3 (PTX3) et le *Tumor necrosis factor-alpha-inducible protein 6* (TNFAIP6) (Park, Su et al. 2004, Richards 2007, Russell and Robker 2007). L'ensemble de ces protéines, en présence de la protéine IαI, forme une matrice extracellulaire visqueuse qui enveloppe l'ovocyte et provoque l'élongation des

prolongements cytoplasmiques liant les cellules du cumulus à l'ovocyte, occasionnant l'éloignement des cellules du cumulus par rapport à l'ovocyte. Cette expansion du COC contribue à atténuer la communication entre les cellules du cumulus et l'ovocyte, à détacher les CG de la paroi folliculaire et à favoriser le transport du COC vers l'antre pour sa sortie du follicule lors de l'ovulation.

### **1.3.3 - Changements à la paroi folliculaire et lutéinisation**

La relâche du COC lors de l'ovulation nécessite la rupture de la paroi folliculaire à son apex. Cette rupture exige une modification des différentes couches composées des CG, de la membrane basale, des cellules de la thèque interne et externe ainsi que de la membrane basale et l'épithélium recouvrant la surface de l'ovaire. Tel que mentionné à la section 1.3.2, la relâche préovulatoire de LH induit diverses familles de protéases tel que les MMP, ADAMTS, ADAM, les activateurs du plasminogène et des collagénases (Dow, Bakke et al. 2002, Berisha, Steffl et al. 2008). Chez la vache, les protéases dont l'expression est augmentée dans les CG 24 h suivant la relâche ovulatoire de LH sont ADAMTS1, ADAMTS9, MMP1 et PLAT ainsi que les éléments contrôlant l'action de certaines protéases tel que TIMP1 principalement et TIMP2 (Lussier, Diouf et al. 2017). L'action de ces protéases cause une modification de l'ensemble de la paroi folliculaire et l'amincissement de l'apex du follicule pour permettre la sortie du COC du follicule vers l'oviducte. L'expulsion du COC est sous le contrôle de l'endothéline 2 (EDN2) (Klipper, Levit et al. 2010) qui, de par son action à stimuler les cellules qui possèdent des fibres contractiles entourant le follicule, occasionne une contraction de la paroi du follicule et provoque l'éjection du COC (Cacioppo, Lin et al. 2017). Sous l'effet de la relâche préovulatoire de LH, les CG et de la thèque se différencient respectivement en grandes et petites cellules lutéales et contribuent à une large part à la formation du CL. Ces cellules sont responsables de la synthèse des stéroïdes, principalement de la P4, et, pour une moindre part, d'androgènes (Niswender, Juengel et al. 2000). La perte d'intégrité de la membrane basale séparant la granulosa et la thèque permet l'infiltration des cellules de la thèque, des cellules immunitaires ainsi que la formation de vaisseaux sanguins vers l'antre du follicule (Berisha and Schams 2005, Miyamoto, Shirasuna et al. 2013, Woad and Robinson 2016). Des études ont démontré que la néovascularisation du follicule suite à une hypoxie de courte durée est initialement le résultat de l'activation du facteur de transcription *Hypoxia inducible factor alpha subunit* (HIF $\alpha$ )

(Meidan, Klipper et al. 2013, Nishimura and Okuda 2015, Thompson, Brown et al. 2015). Suivant son activation, HIF stimule un facteur important de l'angiogenèse, le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Fraser, Wilson et al. 2005) ainsi que le *Fibroblast growth factor 2* (FGF2) (Yamashita, Kamada et al. 2008, Laird, Woad et al. 2013) et l'endothéline 2 (Cacioppo, Lin et al. 2017) qui contribuent à l'angiogenèse du CL en formation.

### **1.3.4 - Modification de l'expression génique dans les CG par la LH**

Les gènes exprimés dans les CG et de la thèque contribuent à la croissance des follicules et à la mise en place du follicule dominant ou préovulatoire. Sous l'effet de la relâche ovulatoire de LH, l'expression génique dans le follicule préovulatoire est modifiée. L'expression de certains gènes est régulée à la baisse ou suspendue tandis que d'autres gènes sont induits ou augmentés. Chez la vache, plusieurs groupes de recherche ont étudié la variation de l'expression génique au cours de la période périovulatoire dans le follicule dominant ou préovulatoire précédent (Fayad, Levesque et al. 2004, Skinner, Schmidt et al. 2008, Hatzirodos, Irving-Rodgers et al. 2014, Hatzirodos, Hummitzsch et al. 2015, Hatzirodos, Glister et al. 2017) et suite à la relâche de LH (Ndiaye, Fayad et al. 2005, Li, Jimenez-Krassel et al. 2009, Gilbert, Robert et al. 2011, Christenson, Gunewardena et al. 2013, Lussier, Diouf et al. 2017, Romereim, Summers et al. 2017). À la lecture de ces publications, il est possible de dégager une liste consensuelle de gènes des CG dont l'expression est réduite ou augmentée par la LH. Toutefois, on remarque parmi ces publications une grande variabilité dans l'identification des gènes rapportés. L'origine des différences entre ces études peut découler de la conception expérimentale et des traitements utilisés chez les animaux pour les études *in vivo* ou de l'utilisation du modèle de CG récoltées à l'abattoir et mises en culture puis traitées à la LH (Christenson, Gunewardena et al. 2013, Hatzirodos, Glister et al. 2017). De plus, les méthodes d'analyse utilisées, soit par l'utilisation de génothèques soustraites ou par micro-réseaux, peuvent introduire un biais dans les résultats obtenus. À titre d'exemple, l'analyse par micro-réseaux se limite aux gènes connus et présents sur le réseau. La validation récente de techniques de séquençage de nouvelle génération ne se limite pas aux gènes connus et codants, mais peut inclure les différentes classes d'ARN non-codants tels que les micro-ARN et les longs ARN non-codants qui jouent un rôle fonctionnel. Ces nouvelles approches de séquençage à haut débit



permettront une analyse plus en profondeur afin d'établir les variations du transcriptome des CG chez les différentes espèces.

Une étude réalisée dans notre laboratoire a comparé le profil d'expression génique des CG bovines récoltées de follicules ovulatoires stimulés à la LH/hCG comparativement aux follicules dominants ou préovulatoires (Lussier, Diouf et al. 2017). Le gène *Ankyrin-repeat and SOCS Box protein 9* (ASB9) a été identifié pour la première fois en tant que gène induit par la LH/hCG toutes espèces confondues. Toutefois la fonction d'ASB9 dans les CG était inconnue. La protéine ASB9 est composée de six répétitions d'un domaine ankyrine qui sont localisées en portion N-terminale et d'une boîte SOCS localisée en portion C-terminale. Une description détaillée de la fonction de la boîte SOCS et des domaines ankyrine permettra d'en apprécier la fonctionnalité.

## Chapitre 2 – ASB9

### 2.0 - Ankyrin SOCS-box protein 9

La protéine *Ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9* (ASB9) bovine est constituée de 297 acides aminés (aa) traduite à partir d'un ARNm de 1593 paires de bases (pb). Cet ARNm est transcrit à partir d'un gène composé de huit exons situés sur le chromosome X chez la vache. La protéine ASB9 est composée de six répétitions d'un domaine ankyrine qui sont localisées en portion N-terminale et d'une boîte SOCS localisée en portion C-terminale. Bien que les boîtes SOCS et les protéines ASB soient très répandues chez les mammifères, peu importe le système ou l'organisme étudié, très peu d'information est disponible en lien à leurs fonctions biochimiques et biologiques.

### 2.1 - Les boîtes SOCS

#### 2.1.1 - Les protéines SOCS et la suppression du signal des cytokines

La boîte SOCS représente le domaine fonctionnel d'importance d'ASB9 qui est conservé chez les mammifères ainsi que chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et chez *Caenorhabditis elegans*. Ce domaine est composé de 44 aa et se retrouve dans une multitude de protéines de plusieurs familles différentes. En 2002, on rapportait plus de 40 protéines contenant une boîte SOCS dans neuf familles différentes (Kile, Schulman et al. 2002). Quatre ans plus tard, on en recensait plus de 70 (Piessevaux, Lavens et al. 2008) et en 2012, on en comptait au moins une dizaine de plus (Linossi and Nicholson 2012).

Lors de leur découverte en 1997, les boîtes SOCS ont d'abord été identifiées chez des protéines ayant la capacité d'inhiber la signalisation des récepteurs transmembranaires JAK-STAT (Endo, Masuhara et al. 1997, Naka, Narazaki et al. 1997, Starr, Willson et al. 1997). Ces protéines ont donc été nommées protéines SOCS pour *Suppressor Of Cytokine Signaling*. Il est intéressant de noter qu'un des trois groupes à avoir identifié SOCS1, celui de Yoshimura (Endo, Masuhara et al. 1997), utilisait le système double hybride dans les levures (Y2H) avec le

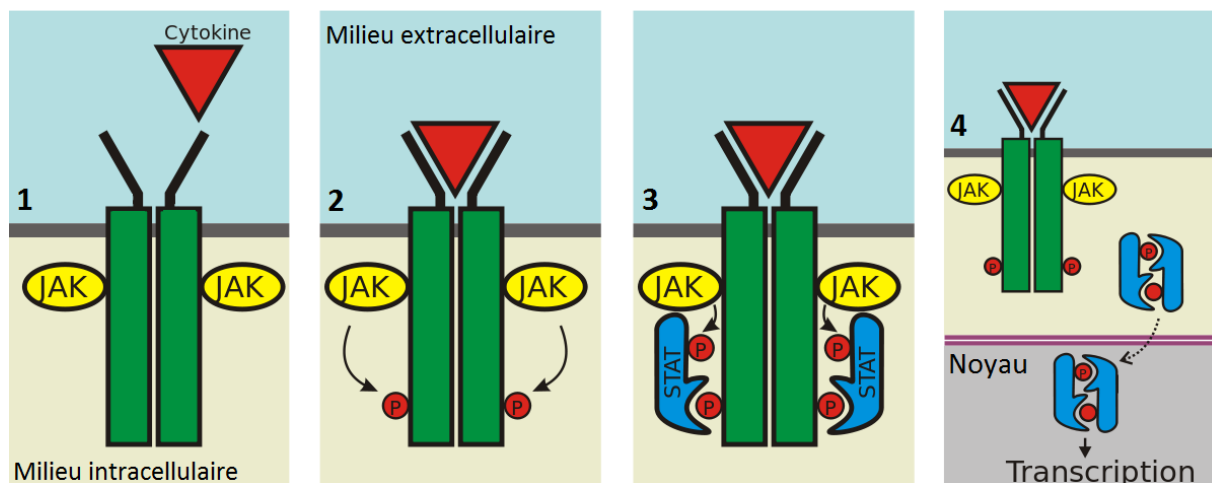
domaine kinase de JAK comme proie. Il nomma alors la protéine JAB pour *JAK-binding protein* (Linossi, Babon et al. 2013). C'est cependant l'appellation protéine SOCS qui fut retenue. Il est important d'établir une distinction entre les protéines SOCS et les boîtes SOCS. Les premières composent une famille de protéines servant principalement à inhiber le signal de transduction des cytokines utilisant le récepteur transmembranaire JAK-STAT, alors que les boîtes SOCS représentent un domaine fonctionnel, initialement découvert chez les protéines SOCS, mais qui est aussi partagé chez un très grand nombre d'autres protéines ne se limitant pas à la famille des protéines SOCS (SOCS1 à SOCS7).

Afin de comprendre comment les protéines SOCS inhibent la voie de transduction JAK-STAT, il faut initialement comprendre comment cette dernière se met en place. En premier lieu, lorsque les cytokines atteignent la membrane de leur cellule cible, elles provoquent la dimérisation de leurs récepteurs (**Figure 3**). À l'intérieur de la cellule s'en suivent le recrutement et la juxtaposition des JAKs sur ce même récepteur. De ce fait, les protéines JAK augmentent ainsi leur fonction de phosphorylation. Les protéines JAKs activées phosphorylent alors des résidus tyrosines localisés au domaine cytoplasmique du récepteur créant ainsi des points d'ancrage pour des protéines possédant un domaine de liaison de type SH2 retrouvé principalement chez les protéines STATs. Une fois liés à ces points d'ancrage, les signaux de transduction et d'activation de la transcription, soit les protéines STATs, sont à leur tour phosphorylées par JAK. Cette dernière phosphorylation leur permet alors de former des dimères, pour finalement se déplacer jusqu'au noyau, où ils s'associent à leur élément de réponse afin d'initier la transcription de leurs gènes cibles. Les protéines SOCS font partie de ces gènes cibles. Ces dernières jouent donc un rôle de rétrocontrôle négatif sur la transduction du signal des cytokines qui les a induites (Kile, Schulman et al. 2002).

### **2.1.2 - Le fonctionnement des protéines SOCS**

Les protéines SOCS jouent un rôle de rétrocontrôle négatif en inhibant la voie de transduction JAK-STAT. Elles peuvent remplir leur fonction principalement de trois façons (Piessevaux, Lavens et al. 2008, Linossi and Nicholson 2012). Elles peuvent soit inhiber l'action de JAK, soit bloquer les sites de liaison de STAT au récepteur transmembranaire ou finalement, elles peuvent participer à la dégradation de JAK et du récepteur transmembranaire en utilisant

le principe d'ubiquitination qui permet d'orienter le complexe ubiquitylé vers la voie de dégradation dans les protéasomes.



**Figure 3.** Principales étapes d'activation du récepteur JAK-STAT.

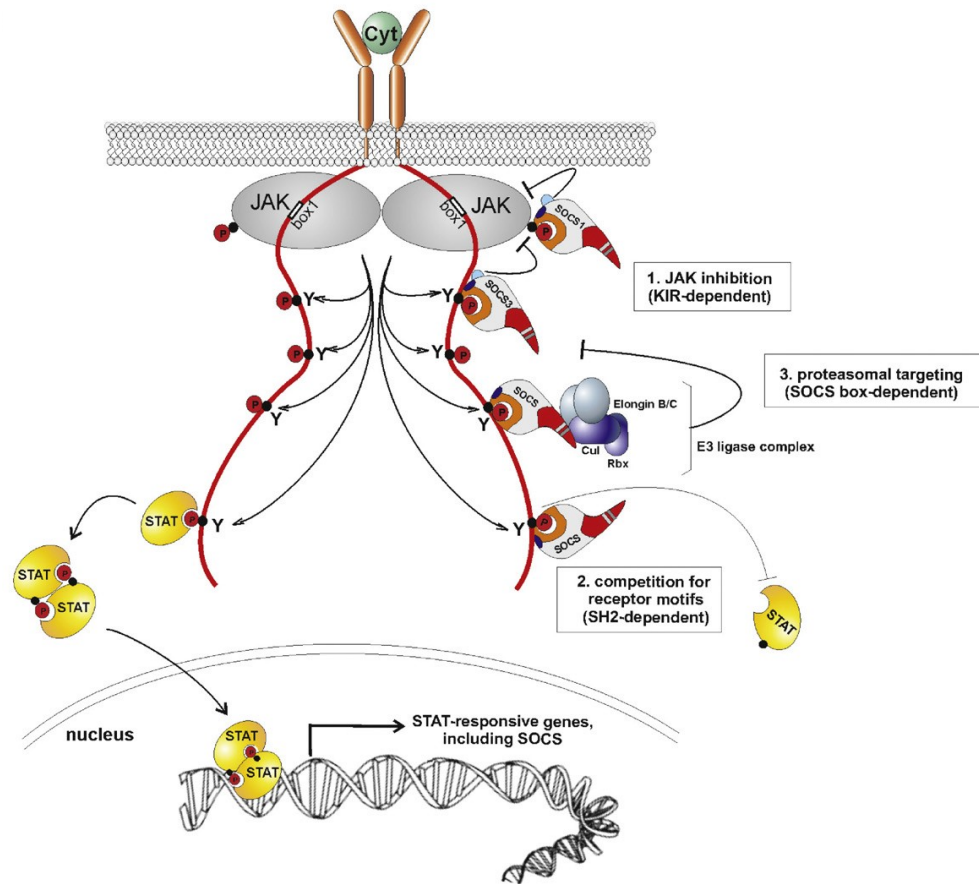
1- Lorsqu'une cytokine atteint la membrane de sa cellule cible, elle provoque la dimérisation du récepteur JAK-STAT. À l'intérieur de la cellule les protéines JAKs se lient sur ce même récepteur. 2- Une fois activées, les protéines JAKs phosphorylent des résidus tyrosines localisés au domaine cytoplasmique du récepteur créant ainsi des points d'ancrage pour les protéines STATs. 3- Une fois liés aux résidus tyrosines, points d'ancrage, les protéines STATs, sont à leur tour phosphorylées par JAK. 4- Cette dernière phosphorylation permet aux protéines STATs de former des dimères qui se déplaceront jusqu'au noyau pour s'associer à leur élément de réponse afin d'initier la transcription de gènes cibles, dont les protéines SOCS. Adapté de Peter Znamenskiy, domaine public

La première modalité de suppression du signal de transduction est seulement réalisable par SOCS1 et SOCS3. Ces deux protéines, en plus de contenir une boîte SOCS et un domaine de liaison SH2 possèdent une région inhibitrice de la kinase (KIR: *Kinase Inhibitory Region*) illustrée à la **Figure 4**, encadré 1. Initialement, on croyait que ce domaine KIR agissait comme

un pseudo-substrat se liant au site actif de JAK empêchant la phosphorylation des substrats de JAK. En fait, KIR n'empêche pas l'activation de JAK, mais se fixe plutôt à côté et empêche l'accès des substrats au site actif (Linossi, Babon et al. 2013). Ce mécanisme d'action est donc considéré comme un antagonisme allostérique plutôt qu'un antagonisme compétitif.

La deuxième modalité de fonctionnement des protéines SOCS qui est illustrée à l'encadré 2 de la **Figure 4** est médiée par le domaine d'interaction protéine-protéine de type SH2. Comme ce domaine est présent chez l'ensemble des protéines SOCS, soit SOCS1 à SOCS7, ces protéines peuvent concurrencer STAT en bloquant les résidus phosphotyrosines localisés au domaine intracytoplasmique du récepteur transmembranaire. En fait, cette liaison aux phosphotyrosines possède une double fonction inhibitrice ; en plus d'empêcher l'ancrage de STAT, elle permet le rapprochement de la boîte SOCS de la protéine SOCS, dans les environs de JAK (Linossi, Babon et al. 2013).

La troisième modalité de fonctionnement des protéines SOCS qui est illustrée à l'encadré 3 de la **Figure 4**, est la plus pertinente dans le cas de la présente étude sur ASB9 puisqu'elle cible la boîte SOCS proprement dite. On peut donc en extrapoler le principe à l'ensemble des protéines contenant une boîte SOCS. Lors de ce mécanisme de fonctionnement, les protéines SOCS fixent leur substrat, soit la protéine JAK ou le récepteur transmembranaire, via leur domaine de liaison SH2 localisé à l'extrémité N-terminale pendant que la boîte SOCS, à la portion C-terminale, sert de base à l'échafaudage d'un complexe enzymatique de liaison de l'ubiquitine nommé E3. Ce complexe marquera le substrat avec une série d'unités d'ubiquitine afin qu'il soit ciblé puis dégradé dans les protéasomes. Les différentes étapes de la polyubiquitination seront abordées à la section 2.1.3.



**Figure 4.** Illustration des trois modes de fonctionnement des protéines SOCS afin d’inhiber le signal de transduction JAK-STAT du récepteur transmembranaire.

*La voie de signalisation activée de JAK-STAT est représentée à gauche tandis que les trois différents modes d’inhibition de la transduction du signal par les protéines SOCS sont représentés à droite. 1- Les protéines SOCS (SOCS 1 et 3) peuvent inhiber directement les protéines JAK, via leur domaine KIR, en agissant comme antagonisme allostérique. 2- Elles peuvent aussi, via leur domaine SH2 concurrencer STAT en bloquant les résidus phosphotyrosines localisés au domaine intracytoplasmique du récepteur transmembranaire. 3- Finalement, les protéines SOCS peuvent fixer la protéine JAK ou le récepteur transmembranaire pour former un complexe enzymatique de liaison de l’ubiquitine E3 dans le but de le dégrader dans les protéasomes. Tiré de (Piessevaux, Lavens et al. 2008, Linossi and Nicholson 2012)*

Même en absence de la boîte SOCS, la liaison de la protéine SOCS1 avec son substrat (via le domaine SH2) a un rôle notable à jouer dans la régulation du signal de transduction (Kile, Schulman et al. 2002). Cependant, les effets de la délétion des boîtes SOCS de SOCS1 ou SOCS3 sont beaucoup plus modestes que les effets de la délétion complète des régions codant pour les gènes en entier, incluant notamment le domaine KIR. Cela démontre que même si l'ubiquitination joue un rôle notable, la capacité de contrôler directement l'activité enzymatique de JAK par le domaine KIR est de première importance pour les protéines SOCS 1 et 3 (Linossi, Babon et al. 2013).

Il est intéressant de noter que SOCS2 peut démontrer un effet bivalent. À faible concentration, il supprime modérément les réponses du signal de transduction de l'hormone de croissance, tandis qu'en concentration élevée il en restaure les effets (Favre, Benhamou et al. 1999). Il semblerait que SOCS2 puisse se lier à tous les membres de la famille des protéines SOCS puis causer leur dégradation via les protéasomes. Ainsi, le mécanisme d'inter-régulation des protéines SOCS fonctionne généralement de façon séquentielle. L'expression de SOCS1 et SOCS3 est induite rapidement, mais de façon transitoire et joue un rôle de rétrocontrôle négatif sur les voies de signalisation des cytokines. L'expression de SOCS 2 arrive plus tardivement, mais démontre une action plus prolongée. L'action différentielle des protéines SOCS aurait comme conséquence de restaurer la sensibilité des cellules aux signaux des cytokines pour les stimulations subséquentes (Piessevaux, Lavens et al. 2006, Piessevaux, Lavens et al. 2008).

Pour conclure, plusieurs pathologies sont associées au contrôle aberrant des protéines SOCS (Piessevaux, Lavens et al. 2008). Par exemple, un dérèglement de SOCS1 contribuerait au diabète de type 2 en participant à la résistance à l'insuline. La protéine SOCS2 pourrait soutenir le développement de certains cancers en inhibant d'autres protéines SOCS ayant comme fonction de supprimer le développement de la tumeur. Finalement, SOCS3 serait impliqué dans l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la maladie inflammatoire des intestins (IBD) et même l'obésité via une résistance à la leptine.

### 2.1.3 - Le rôle des boîtes SOCS

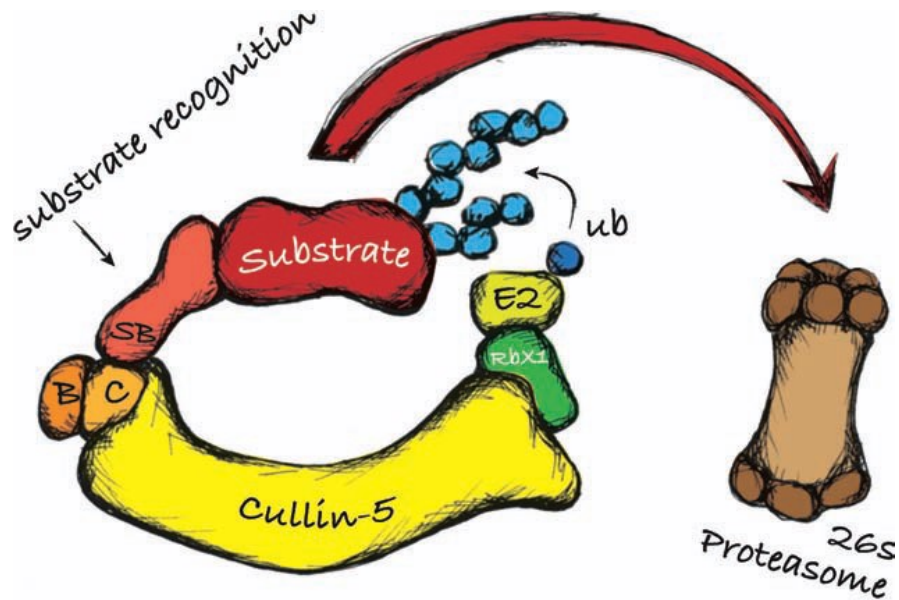
Les boîtes SOCS se retrouvent dans plusieurs protéines et ne se limitent pas à la famille des protéines SOCS. La boîte SOCS est une séquence conservée de 40 acides aminés située en portion C-terminale d'une protéine. En portion N-terminale de la même protéine, on retrouvera un domaine de liaison ciblant une protéine spécifique. Le rôle principal de la boîte SOCS est de servir de base à la formation d'un complexe enzymatique d'ubiquitination nommé E3. Suite à la formation du complexe E3, celui-ci permettra de marquer la protéine spécifique afin de la diriger vers un processus final de dégradation et de recyclage. La protéine cible à dégrader peut provenir de diverses origines. Il peut s'agir d'une protéine vieillissante, d'une protéine ayant une conformation inadéquate ou tout simplement, d'une protéine saine subissant un processus de rétrocontrôle négatif afin de réduire sa demi-vie. Plus précisément, les boîtes SOCS sont des : « modules de reconnaissance d'une protéine substrat qui servent d'intermédiaires pour sa polyubiquitination et permettent subséquentement de cibler le substrat vers les protéasomes 26S pour sa dégradation » (traduction libre, Linossi and Nicholson 2012).

Le processus d'ubiquitination se produit en trois étapes à l'aide de trois enzymes différentes nommées E1, E2 et E3 (Kile, Schulman et al. 2002). La première enzyme, E1 est responsable de l'activation de l'ubiquitine et nécessite un apport d'ATP. La seconde enzyme, E2, est celle qui permet la conjugaison de l'ubiquitine. Elle catalyse la réaction qui permet de transférer une unité d'ubiquitine activée de l'enzyme E1 au complexe d'ubiquitination. La troisième et dernière enzyme, E3, est l'enzyme de liaison de l'ubiquitine. À partir de la boîte SOCS, l'ensemble du complexe formé est désigné par E3. Elle permet la liaison d'une ou de plusieurs unités d'ubiquitine à une protéine cible afin de marquer cette dernière. Une fois marquée de cette façon, la protéine est souvent dirigée vers les protéasomes afin d'être dégradée puis recyclée. Par contre, l'ajout d'ubiquitine peut aussi affecter la fonction, la localisation et les interactions d'une protéine sans nécessairement la diriger vers les protéasomes. Le système ubiquitine/protéasome est particulièrement présent dans la progression du cycle cellulaire et dans les cascades des signaux de transduction. Un dérèglement de cette voie d'ubiquitination peut mener au cancer, à des pathologies auto-immunes, ainsi qu'à plusieurs maladies inflammatoires chroniques (Linossi and Nicholson 2012).



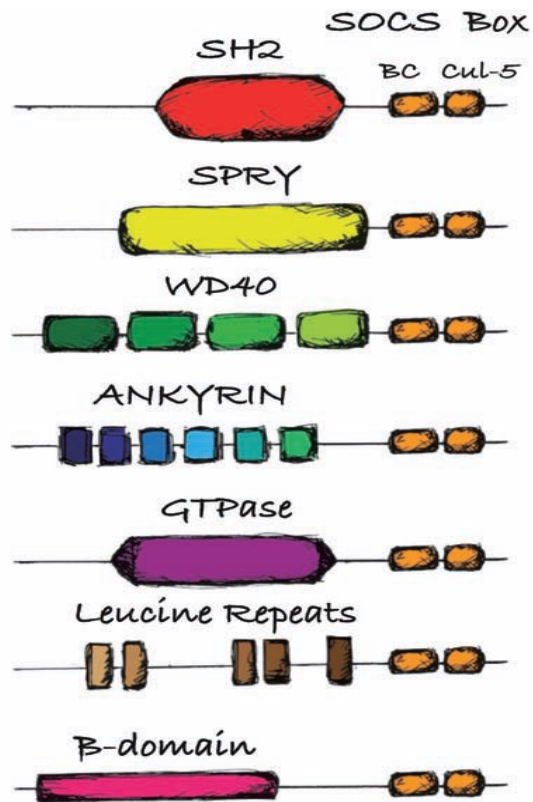
## 2.1.4 - Mécanisme de l'ubiquitination par les boîtes SOCS

Une description du mécanisme d'échafaudage du complexe de liaison de l'ubiquitine E3 est nécessaire afin d'en comprendre son fonctionnement. Au total, il existe plus de 600 ligases d'ubiquitine E3. Ce sont les différentes composantes de l'échafaudage qui déterminent le type de ligase E3 formé. L'ensemble des ligases d'ubiquitine E3 peuvent se séparer en deux classes, soit : 1) les ligases comprenant un domaine catalytique *Really Interesting New Gene* (RING); et 2) les ligases possédant un domaine *Homologous to E6-associated protein Carboxyl Terminus* (HECT) (Deshaies and Joazeiro 2009). Les protéines contenant une boîte SOCS font partie de la première classe qui se nomme *Cullin-RING E3 Ligases* (CRLs). Les CRLs comportent deux protéines d'importance qui forment la base de la ligase d'ubiquitine E3. Une protéine RING (RBX1 ou RBX2) qui a pour fonction de recruter l'enzyme de conjugaison E2 et une culline (Culline1, 2, 3, 4a, 4b, 5 or 7) sert de plateforme à l'ensemble du complexe (**Figure 5**). La forme incurvée de la culline permet de rapprocher l'enzyme vers la protéine cible (ou le substrat). Linossi et Nicholson (2012) rapportent que les différents CRLs conservent une même structure incurvée suggérant que leur mécanisme d'ubiquitination repose de façon importante sur l'arrangement spatial et le positionnement du substrat: la culline et la protéine RING se disposent en forme de croissant et constituent le noyau catalytique nécessaire pour l'ubiquitination du substrat (**Figure 5**). Finalement, deux autres protéines d'importance sont présentes afin de lier et de stabiliser la culline à la boîte SOCS. Il s'agit des élongines B et C. Le tout forme ce qu'on désigne par une CRL de type *Elongin-C-Cullin-SOCS-box* (ECS). La **Figure 5** illustre l'échafaudage d'une ligase d'ubiquitine E3 CRL de type ECS contenant une boîte SOCS. De plus, certaines études rapportent que les élongines permettent de stabiliser les protéines contenant une boîte SOCS en l'absence d'autre liaison afin de les protéger de la dégradation (Kamura, Sato et al. 1998, Haan, Ferguson et al. 2003). En effet, la boîte SOCS est seulement partiellement repliée en l'absence des élongines B et C et leur présence est requise pour stabiliser la protéine (Babon, Sabo et al. 2008). Ce sont deux parties importantes de la boîte SOCS qui créent les interactions essentielles entre la boîte SOCS et le reste de l'échafaudage de la ligase d'ubiquitine E3 soit: la boîte BC en N-terminale puis la boîte CUL en C-terminale. La boîte BC recrute les élongines B et C pour lier une culline à la boîte SOCS tandis que la boîte CUL est plutôt responsable de la spécificité de cette culline.



**Figure 5.** Représentation de la formation du complexe ligase E3.

*Le recrutement de la protéine substrat s'effectue par le domaine ankyrin de la protéine ASB. La boîte SOCS de la protéine ASB permet son association au complexe ligase E3 (CRL-ECS) qui effectue l'ubiquitination de la protéine substrat pour permettre son ciblage vers le protéasome pour sa dégradation. Élongin B et C : protéines adaptatrices; Cullin-5 : une protéine plate-forme; RBX1 : une protéine de la famille RING; E2: l'ubiquitine ligase E2. Adapté de (Linossi and Nicholson 2012).*



**Figure 6.** Représentation des diverses familles de protéines à boîtes SOCS.

*Les boîtes SOCS placées en portion C-terminale permettent de se lier aux Élongins B et C et Cullin. Les boîtes SOCS sont retrouvées dans diverses protéines impliquées dans les mécanismes de signalisation cellulaire. La portion N-terminale varie entre les familles de protéines. Ces protéines présentent des domaines fonctionnels d'interaction protéine-protéine différents qui déterminent spécifiquement la liaison à la protéine substrat. Ces domaines sont de type SH2, SPRY, WD40, à répétition de motifs ankyrine ou de leucine ainsi que d'autres domaines tels que GTPases et B-domain. Adapté de (Linossi and Nicholson 2012).*

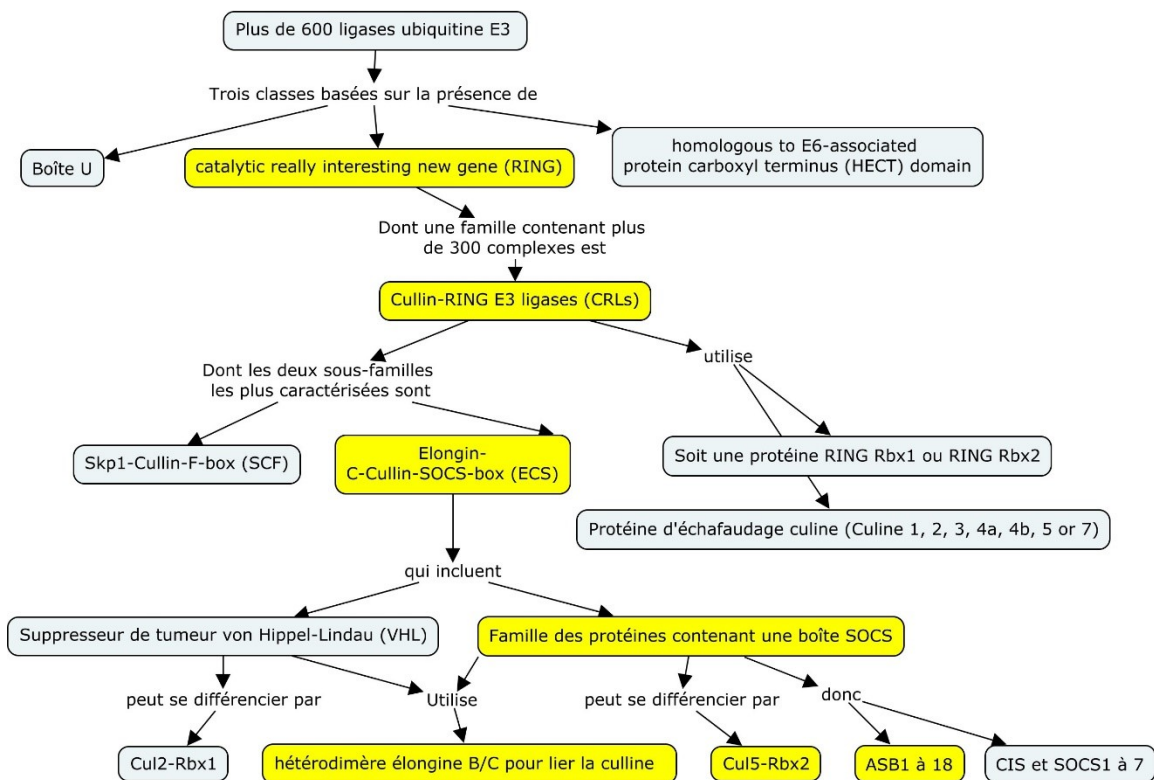
Les ligases d'ubiquitine E3 CRL de type ECS de la large famille contenant une boîte SOCS se distinguent des autres ECS par leur spécificité à lier CUL5 et RBX2. Par opposition, le suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL), un autre type d'ECS, lie plutôt CUL2 et RBX1 (Kamura, Maenaka et al. 2004). Les différents types de ligases d'ubiquitine E3, en passant par les CRL et les ECS, sont mis en relation à la **Figure 7**.

La spécificité pour l'ubiquitination et la dégradation du substrat est déterminée par chacune des ligases E3 grâce au domaine de liaison protéique variable situé en portion N-terminale de la protéine contenant une boîte SOCS. Il existe donc une déclinaison de sous-familles de ligase d'ubiquitine E3 CRL de type ECS contenant une boîte SOCS (**Figure 6**). Leurs fonctions étant inconnues lors de leur découverte, ces protéines ont été nommées sur la base de leur structure. Par exemple la famille utilisant des répétitions de motifs ankyrines pour lier son substrat fut nommée tout simplement : *Ankyrin-repeat and SOCS Box containing protein* (ASB). Il en va de même pour *SPRY-domain protein with a SOCS Box* (SSB) et *WD40 repeat protein with a SOCS Box* (WSB).

## 2.2 - Les protéines ASB

Les protéines ASB constituent la plus grande famille de protéines contenant une boîte SOCS (18 chez la souris et l'espèce humaine). Tout comme les autres complexes E3 ligases d'ubiquitine contenant une boîte SOCS de type ECS, il a été démontré que les protéines ASB interagissent avec les élongines B et C ainsi qu'avec la culline 5 et RBX2 (Kohroki, Nishiyama et al. 2005). Les boîtes BC et Cul5 sont des séquences hautement conservées dans la boîte SOCS (**Figure 6**). Bien que les protéines ASB démontrent quelques minimales variations dans les séquences consensus des boîtes BC et CUL, ces dernières sont tout aussi essentielles pour l'interaction avec Cul5-Rbx2 afin de permettre la polyubiquitination. La **Figure 7** illustre la relation qui existe entre la famille des protéines ASB et l'ensemble des ligases d'ubiquitine E3 CRL, notamment ceux de type ECS.

Bien que l'ensemble de l'échafaudage composant la ligase d'ubiquitine E3 des protéines ASB soit semblable aux autres ECS, cette grande famille se distingue, comme leur nom l'indique, par leur domaine de liaison spécifique à la protéine substrat par les répétitions du domaine ankyrine. Les protéines ASB possèdent un nombre variable de ces répétitions tel que présenté au **Tableau II** pour la famille des 18 ASB bovines. Les répétitions des domaines ankyrines sont formées d'une série d'un motif consensus composé de 33 acides aminés. Ce motif est retrouvé autant chez les eucaryotes, les bactéries et les protéines virales. Diverses fonctions lui ont été attribuées soit de récepteur, de régulation du cycle cellulaire, de suppresseur de tumeurs ou de facteur de transcription. De façon générale, le rôle des domaines ankyrines que l'on retrouve répétés à une fréquence variable entre les protéines ASB, semble toujours intimement lié à une fonction d'interaction entre protéines (Bork 1993)



**Figure 7.** Formation des divers complexes protéiques de ligase d'ubiquitine E3.

Résumé réalisé à partir des références suivantes : (Kohroki, Nishiyama et al. 2005, Linossi and Nicholson 2012, Andresen, Smedegaard et al. 2014).

Chaque domaine ankyrine se compose de deux hélices alpha antiparallèles séparées par des boucles. La première des deux hélices alpha, située au centre de la structure, est de nature très hydrophobe (Bork 1993). C'est principalement cette caractéristique qui permet, dans un premier temps, aux différentes répétitions ankyrines d'interagir entre elles. Par la suite, les motifs hélice-boucle-hélice répétitifs inter-reliés sont empilés en paquets de façon à former une plate-forme incurvée, stable, mais malléable. Selon l'intensité de sa courbure, la surface concave permettra une grande variété d'interactions protéines-protéines (Fei, Gu et al. 2012).

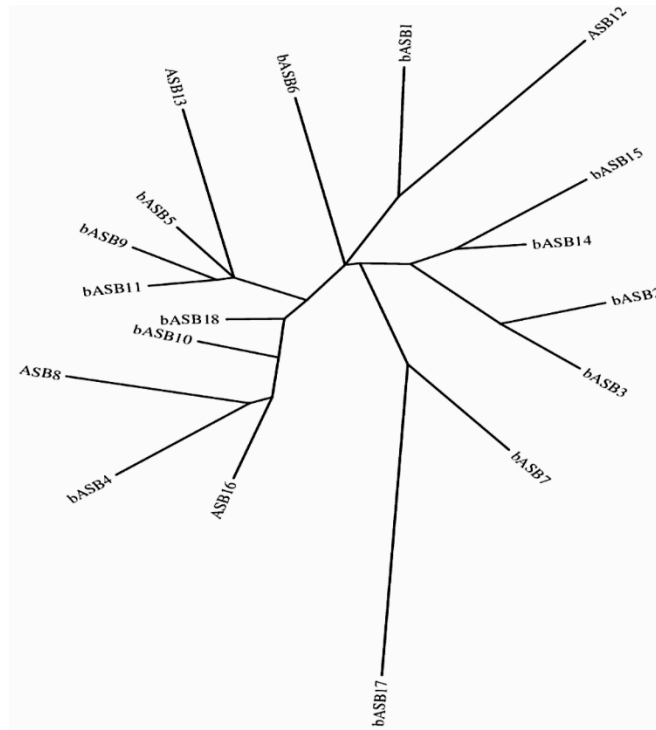
Le séquençage du génome bovin a permis de générer les séquences d'acides aminés des 18 membres de la famille ASB. Le **Tableau II** compare les caractéristiques des protéines ASB dont le nombre de domaines ankyrine et la localisation chromosomique à laquelle ces gènes correspondent. Les études de la fonction biologique des 18 protéines ASB sont limitées peu importe l'espèce. Uniquement quelques protéines ASB ont fait l'objet d'étude afin de démontrer d'une part leur capacité à former le complexe ECS et permettre l'activation de l'ubiquitine ligase E3 (Kohroki, Nishiyama et al. 2005) et d'autre part, de leur associer un rôle biologique spécifique. L'arbre phylogénique à la **Figure 8** indique que la séquence des protéines ASB 5, 9, 11 et 13 forme une sous-famille parmi les 18 membres de la famille des ASB. Ces quatre protéines ASB présentent six domaines ankyrines. De plus, ASB9 et ASB11 démontrent l'homologie de séquence la plus élevée pour l'ensemble de la famille des protéines ASB. Finalement, les gènes d'ASB9 et 11 sont localisés en tandem au chromosome X bovin (**Figure 9**). La proximité de ces deux gènes est aussi conservée chez les autres espèces tel que l'espèce humaine, le rat, la souris, la poule et autres. Les caractéristiques de structure présentées pour ASB9 et ASB11 suggèrent des fonctions biologiques qui pourraient être apparentées.

**Tableau II.** Membres de la famille des gènes ASB chez l'espèce bovine.

<b>Nom</b>	<b>Numéro d'accès de la séquence *</b>	<b>Nombre d'acides aminés</b>	<b>Nombre de domaines ankyrine **</b>	<b>Localisation chromosomique</b>	<b>Nombre d'exons</b>
ASB-1	NP_001193202	332	5	3	5
ASB-2	NP_001029841	633	10	21	10
ASB-3	NP_001070395	525	10	11	13
ASB-4	NP_001179793	426	6	4	5
ASB-5	NP_001069212	329	6	27	9
ASB-6	NP_001192590	421	5	11	6
ASB-7	NP_001179080	318	7	21	8
ASB-8	NP_001069920	288	4	5	4
ASB-9	NP_001178095	287	6	X	8
ASB-10	XP_002687022	462	7	4	8
ASB-11	NP_001029585	323	6	X	12
ASB-12	NP_001179154	305	5	X	19
ASB-13	NP_001179710	278	6	13	6
ASB-14	NP_001030242	584	11	22	14
ASB-15	NP_777112	588	10	4	13
ASB-16	NP_001094658	453	7	19	5
ASB-17	NP_001069898	295	---	3	3
ASB-18	NP_001289881	466	6	3	6

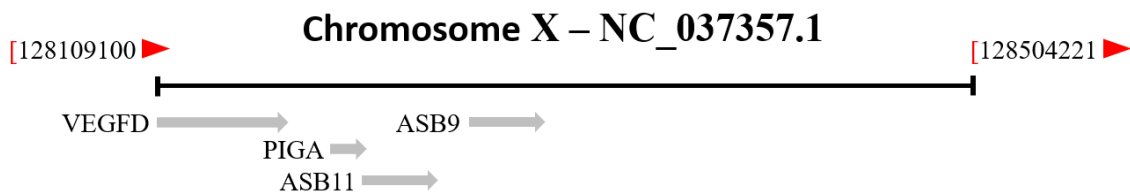
\* Séquence obtenue à partir de la version 106 du génome bovin (Zimin, Delcher et al. 2009).

\*\* Nombre de motifs ankyrine déterminé par le logiciel « InterproScan Tool version 71».



**Figure 8.** Représentation phylogénique des protéines ASB chez l'espèce bovine.

*Plus les protéines sont proches les unes des autres d'un même embranchement, plus leur compositions sont semblables. Par exemple, la séquence des protéines ASB 5, 9, 11 et 13 forme une sous-famille parmi les 18 membres de la famille des ASB. ASB9 et ASB11 démontrent l'homologie de séquence la plus élevée pour l'ensemble de la famille des protéines ASB. Les séquences ont été obtenues de Genbank à partir des numéros d'accès spécifiés dans le **Tableau II**. L'association phylogénique des protéines ASB bovines a été obtenue par analyse Clustal Walis au site [http://www.phylogeny.fr/simple\\_phylogeny.cgi](http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi).*



**Figure 9.** Représentation de la localisation chromosomique d'ASB9 et ASB11 sur le chromosome X bovin.



### 2.2.1 - Les protéines ASB5, ASB11, ASB13

L'objectif de cette section est de résumer l'état des recherches publiées sur les fonctions d'ASB5, ASB11 et ASB13, protéines de la sous-famille des protéines ASB possédant six domaines ankyrines (**Figure 8; Tableau II**) dont fait partie ASB9. La fonction d'ASB13 est inconnue, mais une association a été observée entre l'expression d'ASB13 chez les patientes ayant un cancer du sein. Les patientes présentant un nombre plus élevé de copies du gène ASB13, suite à des mutations somatiques, ont démontré un temps de vie réduit. Un nombre de copies plus élevé d'ASB13 fut associé à une concentration plus élevée de la protéine ASB13, suggérant qu'ASB13 favorise la division cellulaire et contribue au développement du cancer (Chi, Murphy et al. 2018).

La fonction d'ASB5 est aussi inconnue. Toutefois, l'expression d'ASB5 a été observée par immunohistochimie dans les cellules endothéliales des capillaires et des artères en développement ainsi que les cellules musculaires lisses de ces artères. De plus, ASB5 est exprimé dans les cellules satellites de muscles squelettiques alors que les myocytes n'en expriment pas (Boengler, Pipp et al. 2003). Ces premières observations obtenues à partir d'un modèle d'étude sur le développement d'artères collatérales suite à la ligature de l'artère fémorale suggèrent qu'ASB5 est impliqué dans l'initiation de l'artériogénèse. Les cellules satellites sont des cellules progénitrices de myoblastes donnant lieu aux cellules musculaires. En réponse à divers stimuli, dont l'exercice, les étirements et les blessures, ces événements stimulent une augmentation de l'expression d'ASB5 dans les cellules satellites résultant en des myoblastes qui prolifèrent et se différencient pour former de nouvelles cellules musculaires (Seale, Ishibashi et al. 2004). De plus, l'expression d'ASB5 dans les cellules satellites activées génère une progéniture qui reste indifférenciée, rétablissant ainsi la réserve de cellules satellites au repos qui en quelque sorte représente les cellules souches musculaires. L'expression d'ASB5 augmente suite à la présence du facteur de réponse sérique (*serum-responsive factor*), un facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes à expression précoce, et ASB5 serait impliqué dans la multiplication des cardiomyocytes (Zhang, Garcia-Gras et al. 2005). L'étude du profil d'expression génique dans le muscle squelettique chez le porc lors de la phase de récupération suite à une activité physique intense a démontré une augmentation d'ASB5 dans les cellules satellites (Jensen, Conley et al. 2012). En résumé, ASB5 serait impliqué en tant que facteur

précoce des cellules précurseurs favorisant d'une part leur réplication et d'autre part, les engageant vers un cheminement de différenciation finale en cellules musculaires squelettiques et cardiaques ainsi que de cellules endothéliales et musculaires lisses lors de la formation des vaisseaux.

Les premières observations sur la fonction d'ASB11 ont été obtenues à partir du développement du système nerveux central chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). L'extinction (*knockdown*) de l'expression d'ASB11 à l'aide d'un traitement aux oligonucléotides morpholinos chez le poisson zèbre en développement, a réduit le nombre de divisions de cellules préneuronales entraînant une différenciation prématurée des cellules préneuronales vers le phénotype neuronal (Diks, Bink et al. 2006). Le résultat final obtenu fut une réduction du nombre de neurones composant le système nerveux donnant lieu à un cerveau de taille réduite. D'autre part, une surexpression d'ASB11 chez le poisson zèbre a maintenu le développement de la réserve de cellules progénitrices (préneuronales) au détriment de la différenciation terminale en neurone, ce qui a résulté en une hypertrophie du cerveau. Ces données sous-tendent que l'inactivation d'ASB11 entraîne une différenciation prématurée des cellules progénitrices vers un phénotype final neuronal, favorisant la neurogenèse. Dans un autre modèle d'étude utilisant des cellules en culture, l'expression d'ASB11 a permis aux cellules de proliférer indiquant qu'ASB11 peut bloquer la différenciation en neurones terminaux (Diks, Bink et al. 2006). Les résultats démontrent qu'ASB11 exerce un contrôle sur les cellules progénitrices afin de les maintenir en mode prolifératif. Toutefois, lors de la séquence normale du développement du système nerveux, d'autres signaux surviennent dans le temps et occasionnent une baisse d'expression d'ASB11 ayant comme résultat de promouvoir la différenciation finale vers le phénotype neuronal. En outre, l'acide rétinoïque réduit l'expression d'ASB11 (Diks, Bink et al. 2006). En résumé, ASB11 aurait comme fonction de maintenir les cellules progénitrices en mode prolifératif ou indifférencié. L'arrêt de l'expression d'ASB11 provoqué par d'autres signaux extracellulaires permettrait à la cellule de s'engager vers une différenciation finale.

Dans un contexte développemental, le mécanisme d'inhibition latéral explique la raison par laquelle certaines cellules peuvent maintenir leurs caractéristiques indifférenciées parmi des cellules ayant acquis leur phénotype différencié final. Selon les résultats à ce jour, ASB11 serait impliqué dans ce mécanisme lors de la formation du système nerveux (Diks, Sartori da Silva et

al. 2008, Sartori da Silva, Tee et al. 2010). Le mécanisme d'inhibition latéral fait intervenir le récepteur membranaire Notch et son ligand Delta (Bray 2016, Bray and Gomez-Lamarca 2018). Delta est une protéine extracellulaire ancrée à la membrane cellulaire à l'aide d'un passage transmembranaire; Delta est formé par la cellule émettrice (*sending cell*). Sur une cellule adjacente (*receiving cell*), le récepteur membranaire Notch est exprimé. Delta, exprimé par la cellule émettrice, s'ancre et active Notch localisé à la cellule adjacente. La liaison Delta-Notch provoque la protéolyse de la portion intracellulaire du récepteur Notch qui active sa voie canonique de signalisation jusqu'au noyau. Ce signal stimule l'expression d'ASB11 dans la cellule réceptrice qui provoque l'ubiquitination de la protéine Delta dans la cellule exprimant le récepteur Notch (Diks, Sartori da Silva et al. 2008, Sartori da Silva, Tee et al. 2010). Cette reconnaissance de la protéine Delta et de son ubiquitination par ASB11 s'effectue dans le réticulum endoplasmique puisqu'ASB11 s'y localise (Andresen, Smedegaard et al. 2014). La dégradation de Delta dans la cellule réceptrice ayant la voie de signalisation canonique du récepteur Notch activé, stimule chez cette cellule le passage à sa prochaine étape de différenciation cellulaire. Les poissons zèbres possédant une mutation à la boîte culline d'ASB11 présente une dysfonction d'ASB11 dans sa capacité à ubiquitiner les protéines. Les individus ASB11 mutés présentent une signalisation défectueuse de Notch qui affecte le destin des cellules lors de la neurogenèse (Sartori da Silva, Tee et al. 2010). En résumé, les résultats démontrent qu'ASB11 est impliqué dans le mécanisme d'inhibition latérale lors du développement du tissu nerveux. Ce mécanisme conduit à la sélection de deux types cellulaires, soit des cellules exprimant Delta qui gardent un statut indifférencié ou d'autre part, les cellules dont la voie de signalisation Notch est activée ce qui leur permet de progresser aux étapes subséquentes de leur programme de différenciation.

Les observations réalisées en lien à l'expression d'ASB11 dans le développement du système musculaire chez le poisson zèbre ont permis de mettre en évidence qu'ASB11 y jouait un rôle (Tee and Peppelenbosch 2010). L'expression d'ASB11 dans le système musculaire fut localisée aux cellules musculaires satellites, soit les cellules progénitrices des myocytes. L'expression augmentée d'ASB11 dans le système musculaire a permis une prolifération accrue des cellules satellites. De façon contraire, une réduction de l'expression d'ASB11 chez une lignée de poisson zèbre présentant une mutation hypomorphique pour ASB11 a causé une

différenciation prématurée des cellules progénitrices musculaires (satellites) et d'autre part, ralenti la régénération cellulaire dans le muscle blessé chez l'adulte. Cette étude a permis de mettre en évidence que l'expression d'ASB11 dans le système musculaire est nécessaire à la multiplication des cellules progénitrices (satellites) tandis qu'une diminution de son expression provoque la différenciation finale des cellules progénitrices en myoblastes puis vers le stade final en myocytes. De façon similaire aux observations obtenues sur le développement du système nerveux chez le poisson zèbre, l'expression d'ASB11 dans le système musculaire de l'embryon constitue un important régulateur du développement initial du système musculaire. De plus, chez l'adulte, ASB11 participerait à la régénération musculaire lors de traumatismes.

### **2.2.2 - La protéine ASB9**

Les connaissances sur l'architecture moléculaire et les interactions d'ASB9 en tant que complexe E3 ligase d'ubiquitine se précisent de plus en plus; les rôles biologiques de cette protéine sont cependant encore peu connus. Certains substrats d'ASB9 ont déjà été bien décrits et validés, notamment la créatine kinase cytosolique de type B (CKB) (Debrincat, Zhang et al. 2007, Balasubramaniam, Schiffer et al. 2015, Schiffer, Malmstrom et al. 2016) et la créatine kinase mitochondriale ubiquitaire (uMtCK) (Kwon, Kim et al. 2010). Toutefois, la plupart des autres protéines liées par ASB9 sont seulement au stade d'identification, voire de prédiction.

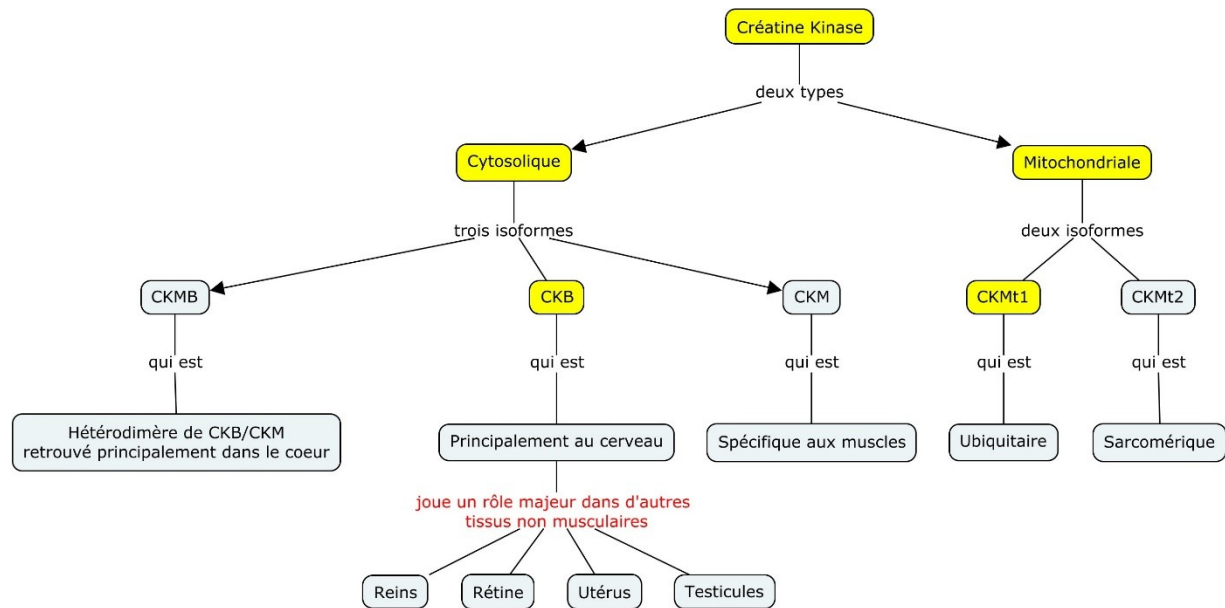
Au même titre que les complexes E3 ligases de type ECS et pour l'ensemble des protéines ASB, il a été confirmé qu'ASB9 forme spécifiquement un complexe stable avec les élongines B et C. Ces dernières lient le domaine N-terminal de la culline 5 (CUL5), mais ne lient pas celui de la culline 2. En plus de lier CUL5, les élongines B et C permettent de stabiliser ASB9 qui est autrement instable dans le cytosol (Thomas, Matak-Vinkovic et al. 2013). L'étude de l'architecture moléculaire et de la conformation quaternaire d'ASB9 permettent de mieux comprendre comment la boîte SOCS de cette protéine peut lier des substrats volumineux comme la créatine kinase, malgré la présence d'un échafaudage encombrant d'autres protéines nécessaires à la polyubiquitination (Muniz, Guo et al. 2013).

La créatine kinase de type B est le premier substrat d'ASB9 qui a été identifié (Debrincat, Zhang et al. 2007). Il a été démontré que la CKB interagit de façon spécifique avec ASB9, mais indépendamment de la boîte SOCS. Cependant, bien que cette dernière soit facultative pour

qu'ASB9 lie la CKB, elle est essentielle pour qu'ASB9 procède à la polyubiquitination puis à la dégradation de la CKB. L'expression protéique d'ASB9 chez la souris est maximale dans les reins et les testicules en plus d'être légèrement présente dans le cerveau et le foie (Debrincat, Zhang et al. 2007). Dans cette même étude, l'utilisation d'une protéine fusion, ASB9 lié à un marqueur, et de la spectrométrie de masse ont permis d'identifier la CKB en tant que partenaire d'ASB9. La liaison unissant ces deux protéines est spécifique; on ne peut la reproduire avec aucun autre membre de la famille des protéines ASB. Il a été démontré qu'ASB9 se lie à un dimère de CKB (Balasubramaniam, Schiffer et al. 2015). Les travaux de Debrincat et al. (2007) ont finalement permis de valider qu'ASB9 cible la CKB pour la dégradation de façon dépendante de la boîte SOCS via les protéasomes en induisant son ubiquitination. Plus l'expression d'ASB9 était élevée, moins CKB fut détecté par immunoblot ou immunofluorescence. En résumé, ASB9 pourrait donc coordonner un mécanisme moléculaire responsable de la régulation post-traductionnelle de la CKB au même titre que les protéines SOCS pour la voie de signalisation JAK-STAT. Parallèlement, il serait tout aussi possible que la régulation de la CKB puisse elle-même avoir un effet sur l'expression et l'activité d'ASB9. Cette hypothèse n'a pas encore été validée.

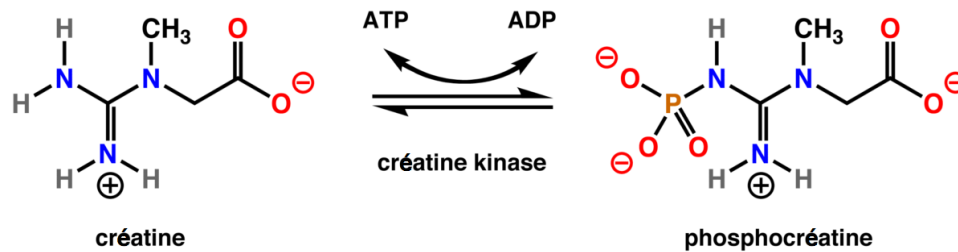
De façon générale, la créatine kinase est une enzyme hautement conservée dans l'évolution qui sert à la régulation et à l'entreposage de réserves d'énergie. Il en existe deux types (**Figure 10**). Le premier type de CK est localisé dans le cytosol et est exprimé principalement dans le cerveau (CKB), les cellules musculaires squelettiques (CKM) et cardiaques (CKMB). Notons que ces trois tissus se comparent par la variation dans la demande élevée et rapide en énergie. La créatine kinase cytosolique catalyse le transfert d'un radical phosphorylé à partir de la phosphocréatine afin de convertir l'ADP en ATP dans les tissus à haute demande énergétique (**Figure 11**). À défaut de pouvoir répondre rapidement à ces demandes, de nombreuses maladies musculaires ou neurologiques surviennent. Plusieurs hormones et facteurs de croissance stimulent l'activité et l'expression de la CKB. Par exemple, l'oestradiol-17 $\beta$ , la testostérone et la vitamine 1,25-dihydroxyvitamine D3 stimulent l'expression de la CKB dans les ostéoblastes contribuant ainsi à la demande énergétique nécessaire pour la formation du tissu osseux (Somjen, Weisman et al. 1989, Ch'ng and Ibrahim 1994). L'oestradiol-17 $\beta$  induit une expression élevée de la CKB dans l'utérus chez la ratte

(Wang, Samudio et al. 2001). Le même phénomène a été observé dans les tumeurs du sein chez la femme (Zhong, Ge et al. 2008). Les analyses fonctionnelles du promoteur proximal de CKB ont permis de démontrer la présence de deux sites de liaison à l'ADN de type ER $\alpha$  pour l'oestradiol-17 $\beta$ , expliquant sa capacité à stimuler l'expression de CKB (Wang, Samudio et al. 2001).



**Figure 10.** Les différentes formes de créatines kinases.

*Les créatines kinases sont de deux types soit, cytosolique et mitochondriale. Elles sont représentées par cinq isoformes dont la créatine kinase du cerveau (CKB), la créatine kinase des muscles (CKM), la créatine kinase du cœur (CKMB), la créatine kinase ubiquitaire (CKMt1) et la créatine kinase sarcomérique (CKMt2). Résumé réalisé à partir de (Debrincat, Zhang et al. 2007)*



**Figure 11.** Réaction catalysée par la créatine kinase

Domaine public

Le deuxième type de CK est localisé dans la mitochondrie. Il en existe deux isoformes soit: la CK mitochondriale ubiquitaire (CKMt1) et la CK mitochondriale sarcomérique (CMMt2). Cette CK mitochondriale démontre une fonction inverse de la CK cytosolique ; elle catalyse la réaction qui transfère un radical phosphoryle de l'ATP vers la créatine afin de générer la phosphocréatine (**Figure 11**). Ces CKMt se localisent dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Il a été démontré qu'ASB9 de par son domaine ankyrine lie la CKMt (Kwon, Kim et al. 2010, Datler, Pazarentzos et al. 2014). Les observations réalisées *in vivo* suite au marquage d'ASB9 et de la CKMt ont démontré que ces deux protéines étaient co-localisées dans la mitochondrie (Kwon, Kim et al. 2010). La surexpression d'ASB9 a occasionné une augmentation de l'ubiquitination de la CKMt suivie de sa dégradation au protéasome (Kwon, Kim et al. 2010, Datler, Pazarentzos et al. 2014). ASB9 interagit avec la CKMt et induit un dysfonctionnement des mitochondries, conduisant à une régulation négative de la croissance cellulaire. La diminution de la CKMt a entraîné une baisse de la différence de potentiel membranaire entre l'espace inter-membranaire et l'intérieur de la mitochondrie occasionnant une réduction du fonctionnement mitochondriale (Kwon, Kim et al. 2010) et pouvant causer l'apoptose (Datler, Pazarentzos et al. 2014). Les lignées cellulaires qui présentaient une expression plus élevée d'ASB9 ont démontré un taux de croissance plus faible. En résumé, ces expériences ont permis de démontrer qu'ASB9 lie la CKMt et la CKB cytosolique afin de causer leur ubiquitination et leur dégradation au protéasome. La destruction de la CKMt et de la CKB entraîne une baisse de l'activité du système créatine kinase de la cellule. Une expression plus élevée d'ASB9 réduirait la capacité de croissance des cellules.

Les résultats d'une étude clinique chez les patients humains qui présentaient un cancer colorectal suggèrent que les patients avec un faible taux d'expression d'ASB9 présentaient un pronostic plus faible de survie comparativement aux patients qui exprimaient un taux élevé d'ASB9 (Tokuoka, Miyoshi et al. 2010). Dans cette même étude, le rôle d'ASB9 a été étudié *in vitro* en analysant la capacité de prolifération et d'invasion des cellules cancéreuses. Les cellules transfectées par un ARN interférant contre ASB9 ont démontré une capacité plus élevée de prolifération et d'invasion comparativement à leur contrôle. Dans le cadre d'une autre étude, la comparaison de l'expression d'ASB9 dans les divers tissus normaux chez l'espèce humaine a démontré l'expression la plus élevée dans les testicules (Fagerberg, Hallstrom et al. 2014). Les résultats spécifiques de cette étude se rapportant à ASB9 se retrouvent au site suivant : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/140462>. Dans le testicule, l'expression la plus élevée en ARNm pour ASB9 se localise aux spermatides rondes (Lee, Kim et al. 2008). Les spermatides rondes sont des cellules haploïdes faisant suite à la méiose II et constituent la première étape de la spermiogénèse. Tel que résumé au paragraphe précédent, ASB9 lie la CKB et la CKMt afin d'augmenter leur destruction. En résulte en une baisse de la capacité de la cellule à produire de l'énergie. Un état énergétique faible limite la prolifération cellulaire. Dans l'étude liée au cancer, ces observations pourraient expliquer la raison pour laquelle les patients humains qui démontraient une expression élevée d'ASB9 ont présenté des formes cancéreuses colorectales moins agressives par rapport aux cancers plus malins. D'autre part, dans l'étude de la spermatogénèse, l'expression d'ASB9 à une étape spécifique pour un type cellulaire tel que les spermatides, pourrait contribuer au programme de différenciation terminal de cette lignée cellulaire.



**PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE, OBJECTIFS ET  
MODÈLES D'ÉTUDE**

# 1 - Problématique et hypothèse

La compréhension des mécanismes associés à la formation du follicule préovulatoire ainsi que les modifications qu'il subit lors de l'ovulation et de sa lutéinisation sont importantes, car ils contribuent à la qualité de l'ovocyte produit et du développement embryonnaire précoce ainsi que de la formation d'un corps jaune fonctionnel pour assurer la gestation. Ces mécanismes associés à la reproduction des animaux d'élevage, dont l'espèce bovine ont des impacts économiques notables pour le maintien de la population des troupeaux ainsi que la production laitière.

**L'ovulation** représente une étape obligatoire dans le processus de la fertilité chez l'ensemble des mammifères. L'ovulation est un processus complexe et étroitement contrôlé qui implique la sélection d'un follicule dominant ou préovulatoire, la réactivation de la méiose de l'ovocyte, la rupture de la paroi du follicule, l'expansion des cellules du cumulus de l'ovocyte ainsi qu'un remodelage tissulaire pour former le corps jaune.

Définir les mécanismes sollicités lors de l'ovulation nous permettra de mieux saisir les phénomènes reliés à l'infertilité et de développer de nouvelles stratégies qui, d'une part, augmenteraient l'efficacité des techniques de reproduction assistée et, d'autre part, permettraient d'entrevoir de nouvelles solutions à la contraception. De plus, l'ovulation représente un modèle de réaction inflammatoire aiguë et contrôlée. Son étude contribuerait à la compréhension des mécanismes associés à certaines pathologies inflammatoires (Richards 2007). Afin de permettre l'expulsion de l'ovocyte hors du follicule vers l'oviducte, l'ovulation présente un modèle de remodelage tissulaire et de différenciation cellulaire (Russell and Robker 2019). Comme en témoigne les nombreuses études réalisées, comprendre le processus de l'ovulation et les mécanismes qui sont sollicités, demeurent une préoccupation scientifique.

Chez de nombreux mammifères, l'ovulation est déclenchée lorsque l'hypophyse antérieure libère une relâche préovulatoire de LH en réponse à des signaux neuroendocriniens. La LH se lie à son récepteur membranaire localisé sur les cellules murales de la granulosa et de la thèque interne. Cet événement endocrinien initial se propage aux cellules du cumulus et à l'ovocyte par un réseau complexe de voies autocrines et paracrines. Les CG représentent une composante particulièrement importante du follicule, car elles jouent un rôle essentiel dans les

fonctions de reproduction. Elles contribuent à la synthèse des hormones stéroïdiennes, à la maturation de l'ovocyte et à la formation du corps jaune suite à l'ovulation. L'activation du récepteur à la LH dans les GC stimule la production d'AMPc, active certaines protéines kinases qui entraînent des modifications de l'expression de gènes spécifiques et de la synthèse de protéines requises aux processus de l'ovulation et de la lutéinisation (Richards and Ascoli 2018).

Une étude réalisée chez la vache a comparé le profil d'expression génique dans les GC de follicules ovulatoires stimulés à l'hCG comparativement à celui des gènes exprimés dans les GC issues de follicules dominants en croissance obtenus à J5 du cycle œstral (Lussier, Diouf et al. 2017). Cette étude a permis d'établir une première liste de gènes différentiellement exprimés dans le follicule ovulatoire qui a permis d'identifier ASB9 en tant que gène induit par la LH. Cependant, au cours de cette étude aucune validation de l'expression différentielle d'ASB9 ni de sa fonction n'a été effectuée. À ce jour, chez l'ensemble des espèces, aucune étude antérieure n'a rapporté ASB9 comme gène induit par la LH lors de l'ovulation. À partir de l'observation de cette étude initiale (Lussier, Diouf et al. 2017), nous avons émis **l'hypothèse** à valider dans le cadre de la présente recherche :

**« L'expression d'ASB9 serait induite par l'hormone lutéinisante (LH) dans les CG et, par sa fonction biologique, ASB9 contribuerait au contrôle de la fonction ovarienne ».**

## **2 - Objectifs**

Afin de valider l'hypothèse de la présente recherche, les objectifs sont d'étudier le profil d'expression d'ASB9 dans les CG en période périovulatoire chez la vache et d'investiguer son rôle physiologique potentiel lors de l'ovulation. Les objectifs spécifiques sont :

1- De comparer l'expression d'ASB9 par RT-qPCR et western blot dans les CG prélevées de follicules à différents stades de développement, soit : petits follicules de 2 - 4 mm, follicule dominant en croissance à J5 du cycle œstral (J0 étant le jour de l'ovulation), le follicule ovulatoire induit à l'hCG et le corps jaune (CL) à J5 ;

2- De comparer l'expression d'ASB9 par RT-qPCR et western blot dans les extraits de paroi folliculaires (thèque interne et CG) de follicules ovulatoires récoltées à 0, 6, 12, 18, et 24 h suite à l'injection d'hCG ;

3- D'identifier les protéines partenaires avec lesquelles ASB9 pourrait potentiellement interagir dans les CG par l'approche double hybride chez la levure et de valider *in vitro* et *in vivo* ces interactions afin d'entrevoir la fonction biologique d'ASB9 lors de l'ovulation ;

4- De comparer l'expression génique des protéines partenaires à ASB9 par RT-qPCR dans les CG de follicules prélevées à différents stades de développement ;

5- D'étudier les effets de l'annulation de la fonction biologique d'ASB9 dans les CG de follicules ovulatoires en utilisant la technologie CRISPER/CAS9.

### **3 - Modèle d'étude et techniques d'analyse employées**

#### **3.1 - Modèle animal et sélection des groupes de follicules**

Afin de répondre aux **objectifs 1, 2 et 4**, les follicules ont été sélectionnés selon des critères morphologiques et physiologiques représentatifs de leur développement. Les follicules dominants et préovulatoires ont été obtenus à partir de vaches dont leur cycle œstral fut synchronisé à l'aide d'une injection de prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). Le jour des chaleurs qui définit le début du cycle œstral désigne le jour (J) 0. Suite à l'ovulation, la première vague de croissance folliculaire a été suivie par échographie transrectale. À J5, les follicules dominants (DF) en pleine croissance présentant un diamètre moyen de  $10,4 \pm 0,3$  mm ( $n = 4$ ) ont été obtenus par ovariectomie. De plus, les CL présents sur l'ovaire à J5 ont été conservés. Les follicules ovulatoires (OF) ont été obtenus suite aux mêmes traitements que ceux décrits pour les DF suivis des traitements suivants : une injection de  $PGF_{2\alpha}$  à J7 puis une dose ovulatoire d'hCG à J9. L'ovariectomie a été réalisée 24 h suivant l'injection d'hCG. L'hCG est utilisée, car elle mime l'action de la LH endogène relâchée par l'hypophyse. L'injection d'hCG intraveineuse a été préconisée, car elle permet de déterminer précisément le temps d'action de l'hCG sur les CG et le temps où le follicule sera récolté. Le temps de libération de la LH

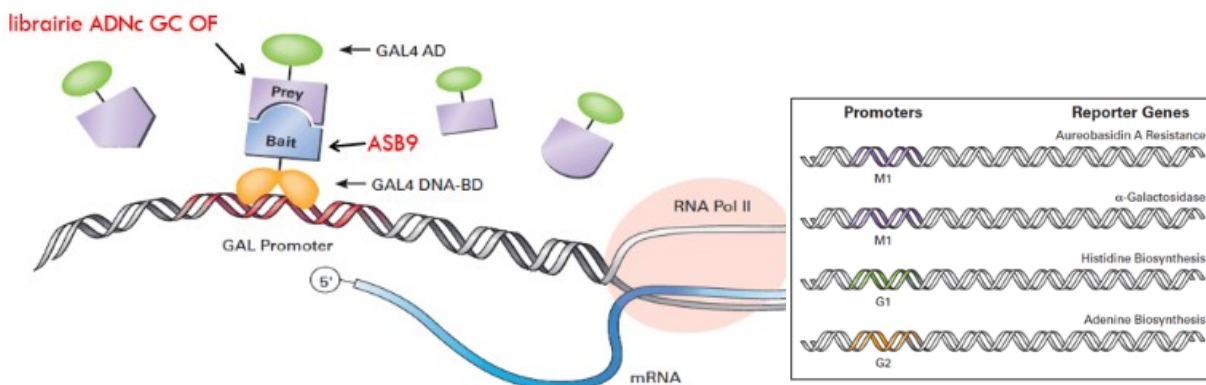
endogène hypophysaire suite à l'injection de PGF2 $\alpha$  est trop variable entre les vaches ce qui a exclu l'utilisation de cette approche. Les follicules préovulatoires présentaient un diamètre moyen de 12,9  $\pm$  0,3 mm (n = 4). De plus, les parois folliculaires constituées de CG et de thèques, ont été obtenus de follicules ovulatoires récoltés par ovariectomie à des temps précis soit à 0, 6, 12, 18 et 24 h (n = 2 follicules par temps), suite à l'injection d'hCG. Ces modèles d'étude ont été utilisés antérieurement (Sayasith, Sirois et al. 2013, Ndiaye, Castonguay et al. 2016).

### 3.2 - Description de la méthode double hybride dans les levures

L'**objectif 3** sera développé en appliquant la méthode d'investigation du double hybride (Y2H) qui permet de mettre en évidence les interactions physiques entre deux protéines (Golemis, Serebriiskii et al. 2011, Vidal and Fields 2014). Le système Y2H exploite la nature modulaire des facteurs de transcription eucaryotes qui consistent en un domaine de liaison à l'ADN (BD) et un domaine d'activation (AD) de la transcription permettant de recruter l'ARN polymérase II pour initier la transcription d'un gène rapporteur ou de sélection (**Figure 12**). Les domaines BD et AD du facteur de transcription GAL4 de la levure sont utilisés afin de générer des protéines fusions.

En résumé, notre protéine d'intérêt ASB9 est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN provenant du facteur de transcription GAL4 créant une protéine fusion dite « d'appât » (ASB9-GAL4/BD) qui est exprimée dans la souche haploïde de levure Y2HGold. Les protéines partenaires qui interagissent avec ASB9 sont dérivées d'ARNm isolés de CG bovines de follicules ovulatoires 24 h suivant l'injection de hCG. Ces ARNm ont servi à construire une librairie de protéines fusions, soit de protéines de granulosa bovine liées au domaine d'activation de la transcription GAL4 de levure (GCs-GAL4/AD). Ces protéines fusions forment les protéines dites « proies » qui sont exprimées dans la souche haploïde de levure Y187. L'accouplement des souches haploïdes Y2HGold et Y187 résulte en une levure diploïde co-exprimant les protéines d'appât et de proie. L'interaction entre ces protéines permet de rétablir la fonction du facteur de transcription GAL4 et d'activer la transcription des gènes rapporteurs et de sélection (**Figure 12**). Suite au criblage, les protéines candidates qui ont démontré une interaction physique avec ASB9 sont validées *in vitro* et *in vivo* par un essai d'interaction par

co-immunoprécipitation ainsi qu'un essai de complémentation. Cette approche expérimentale a été utilisée dans notre laboratoire (Ndiaye, Castonguay et al. 2016).



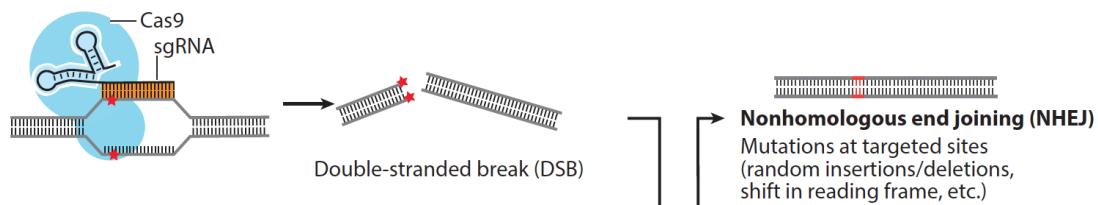
**Figure 12.** Méthode double-hybride dans les levures - Activation des gènes rapporteurs

*La protéine appât (ASB9) est fusionnée à un domaine de liaison BD reconnaissant une séquence spécifique de l'ADN des levures qui est promotrice de 4 gènes rapporteurs. La protéine proie, provenant de la librairie de cADN des CG des OF, sera fusionnée à un domaine d'activation AD. Ces deux constructions sont naturellement introduites dans une levure qui exprimera les deux protéines fusion (BD-ASB9 + AD-librairie ADNc GC OF). La transcription des gènes rapporteurs n'aura lieu que si ASB9 et une protéine de la librairie interagissent. Adapté de Clontech, 2013, Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System [https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Matchmaker%20Gold%20Yeast%20Two-Hybrid%20System%20User%20Manual%20\(PT4084-1\)\\_092413.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Matchmaker%20Gold%20Yeast%20Two-Hybrid%20System%20User%20Manual%20(PT4084-1)_092413.pdf)*

### 3.3 - Études fonctionnelles d'ASB9 dans les cellules de granulosa par l'application de la technologie CRISPR/Cas9

L'objectif 5 vise à étudier la fonction biologique d'ASB9 dans les CG. L'approche préconisée cible l'annulation de l'expression d'ASB9 dans les CG à l'aide de l'application de la technologie CRISPR/Cas9. Suite à l'annulation de l'expression d'ASB9, les effets sur la prolifération cellulaire ainsi que l'expression de marqueurs reliés à la fonction des CG ont été analysés. L'approche CRISPR/Cas9 permet d'éditer l'ADN chromosomique de manière à

modifier de façon spécifique la séquence nucléotidique d'un gène pour le rendre non fonctionnel (Wang, La Russa et al. 2016). Cette approche expérimentale nécessite la synthèse d'un ARN guide simple (ARNgs) et son expression dans la cellule permet de cibler spécifiquement le gène d'intérêt par hybridation de l'ARNgs à l'un de ses brins d'ADN (**Figure 13**). Différents ARNgs complémentaires à la séquence d'ASB9 ont été produits et analysés afin de sélectionner l'ARNgs démontrant l'efficacité la plus élevée à cliver les séquences d'ASB9. Cet ARNgs a été transfecté et exprimé dans les CG afin d'inhiber l'expression d'ASB9.



**Figure 13.** Fonctionnement d'un ARN guide simple dans le système CRISPR/Cas9

*L'ARNsg dirige l'action de la nucléase Cas9 au gène d'intérêt qui clive l'ADN double brin. Les cassures sur chaque brin d'ADN produites par Cas9 sont réparées spontanément par le mécanisme de réparation de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues. Ce mécanisme de réparation non-spécifique introduit une mutation (insertion ou délétion) d'un ou de plusieurs nucléotides dans le gène ciblé annulant ainsi sa fonction.*

*Tiré de (Wang, La Russa et al. 2016)*

# ARTICLE



RESEARCH ARTICLE

## Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners

**Gabriel Benoit, Aly Warma, Jacques G. Lussier, Kalidou Ndiaye** \*

Centre de recherche en reproduction et fertilité (CRRF), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

PLOS ONE

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0212571>

February 27, 2019



## **Gonadotropin regulation of Ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners**

ASB9 regulation and binding partners in granulosa cells

Gabriel Benoit<sup>1</sup>, Aly Warma<sup>1</sup>, Jacques G. Lussier<sup>1</sup>, Kalidou Ndiaye<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup> Centre de recherche en reproduction et fertilité (CRRF), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

\* Corresponding author:

E-mail: [k.ndiaye@umontreal.ca](mailto:k.ndiaye@umontreal.ca) (KN)

## Abstract

Ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) is a member of the large SOCS-box containing proteins family and acts as the specific substrate recognition component of E3 ubiquitin ligases in the process of ubiquitination and proteasomal degradation. We previously identified ASB9 as a differentially expressed gene in granulosa cells (GC) of bovine ovulatory follicles. This study aimed to further investigate ASB9 mRNA and protein regulation, identify binding partners in GC of bovine ovulatory follicles, and study its function. GC were obtained from small follicles (SF: 2-4 mm), dominant follicles at day 5 of the estrous cycle (DF), and ovulatory follicles, 24 hours following hCG injection (OF). Analyses by RT-PCR showed a 104-fold greater expression of *ASB9* in GC of OF than in DF. Steady-state levels of *ASB9* in follicular walls (granulosa and theca cells) analyzed at 0, 6, 12, 18 and 24 hours after hCG injection showed a significant induction of ASB9 expression at 12 and 18 hours, reaching a maximum induction of 10.2-fold at 24 hours post-hCG as compared to 0 hour. These results were confirmed in western blot analysis showing strongest ASB9 protein amounts in OF. Yeast two-hybrid screening of OF-cDNAs library resulted in the identification of 10 potential ASB9 binding partners in GC but no interaction was found between ASB9 and creatine kinase B (CKB) in these GC. Functional studies using CRISPR-Cas9 approach revealed that ASB9 inhibition led to increased GC proliferation and modulation of target genes expression. Overall, these results support a physiologically relevant role of ASB9 in the ovulatory follicle by targeting specific proteins likely for degradation, contributing to reduced GC proliferation, and could be involved in the final GC differentiation into luteal cells.

## Introduction

It is well documented that the cyclic ovarian activity results in profound modifications that require spatio-temporal coordination of proliferation, apoptosis and differentiation of various cell types within the ovarian follicle leading to changes in gene expression [1-4]. During the processes of follicular growth and ovulation, steroidogenic cells including granulosa cells (GC) play a crucial role in the maturation and release of the oocyte. Granulosa cells are a particularly important component of the follicle because they play a critical role in reproductive functions as they contribute to steroid hormone synthesis [1], oocyte maturation [2], and corpus luteum formation after ovulation [4, 5]. The control of GC proliferation and function is complex and depends on the precise regulation and activation of specific target genes. This regulation is essential for normal follicular development and timely production of paracrine factors as it affects the physiological state of the dominant preovulatory follicle. For instance, the transcription of specific genes that control the growth of a bovine dominant follicle is rapidly downregulated or silenced in GC as a result of LH-mediated increases in intracellular signaling [3, 6, 7] while LH upregulates or induces the expression of genes involved in ovulation and luteinization [8]. These observations demonstrate the importance of gene functional studies during the final stages of follicular development and ovulation to better coordinate the ovarian activity. In a previous gene expression profiling study, we identified ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) as a differentially expressed gene in GC of bovine ovulatory follicles following the preovulatory LH-surge [8]. In light of these results, we further investigated the regulation and function of ASB9 in GC of ovarian follicles.

ASB9 is a member of the large SOCS box-containing proteins family. Members of the ASB family have two functional domains, a SOCS box and a variable number of N-terminal ankyrin (ANK) repeats [9]. The SOCS box is a conserved domain present in more than 80 proteins of nine different families [10-12]. Initially described as a suppressor of cytokine signaling, it is now clear that SOCS boxes also play an important role in protein turnover via proteasome-mediated degradation [10, 12]. Within ASB proteins, the SOCS box forms an E3 ubiquitin ligase with elongin B/C, culin 5 and Rbx2 proteins to mediate polyubiquitination and subsequent degradation of specific substrate proteins [12-15]. Ankyrin repeats are motifs stacked side by side to mediate protein-protein interactions [16-18]. Each of the 18 members of

the ASB family binds more than one protein but these binding proteins are generally specific to one member of the ASB family [19]. With its SOCS box in C-terminal and its ankyrin-repeats in N-terminal, ASB9 acts as a specific substrate recognition component of E3 ubiquitin ligases and interacts with various proteins including brain type creatine kinase (CKB) [17-20]. ASB9 modulates some of the creatine kinase system activities in cell growth and in the signaling of specific target genes [20, 21].

Some reports have shown that ASB9 is predominantly expressed in the kidney and testes [22], has been linked to colorectal cancer [23] and could also be a biomarker for human breast cancer [24]. However, no information is available about ASB9 precise regulation and function in the ovary. We report here, for the first time, the differential regulation of ASB9 mRNA and protein expression in ovulatory follicles and its induction by hCG/LH prior to ovulation. We also report novel ASB9 binding partners in GC of ovulatory follicles using the yeast two-hybrid approach as well as an insight into ASB9 function in the ovarian follicle.

## Materials and Methods

### Cloning and characterization of ASB9

We previously established a cDNA library containing transcripts that are upregulated by hCG in GC of ovulatory follicle (OF) using the suppression subtractive hybridization procedure [8]. Following the differential hybridization screening of this library, *ASB9* was identified as a differentially expressed gene in GC of OF as compared to dominant follicles. The full length *ASB9* cDNA (AY438595) and its isoform (AY442176) were characterized following screening of a size-selected GC cDNA library from hCG-induced OF [6].

### Experimental animal model and sample preparations

The regulation of ASB9 expression during follicular development and ovulation was studied using *in vivo* models as previously characterized [3]. Following estrous synchronization with PGF<sub>2α</sub>, normal cycling crossbred heifers were randomly assigned to a dominant follicle group (DF, n = 4), or an ovulatory hCG-induced follicle group (OF, n = 4). In the DF group, the ovary bearing the DF on the morning of day 5 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus) was obtained by ovariectomy. The DF was defined as ≥ 8 mm in diameter and growing while subordinate follicles were either static or regressing. The OF were obtained following an injection of 25 mg of PGF<sub>2α</sub> on day 7 to induce luteolysis, thereby promoting the development of the DF of the first follicular wave into a preovulatory follicle. An ovulatory dose of hCG (3000 IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC) was injected 36 hours after the induction of luteolysis, and ovaries bearing the hCG-induced OF were collected by ovariectomy 24 hours post-hCG. Additional OF were collected at 0, 6, 12, 18, and 24 hours after hCG injection for follicular wall preparation (n = 2 cows/time point). The sample at 0 hour was represented by day 7 dominant follicle. Immediately following ovariectomy, follicles were dissected into preparations of follicular wall (theca layer cells with the attached granulosa cells) [25] or further dissected into separate isolates of granulosa cells [3], and stored at -70°C. Additionally, granulosa cells (GC) were collected from 2 to 4 mm small follicles (SF) obtained from slaughterhouse ovaries, and a total of three pools of twenty SF were prepared. Corpora lutea (CL) at day 5 of the estrous cycle were obtained by ovariectomy and were dissected from the

ovarian stroma, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal.

## mRNA expression analysis

Expression and regulation of *ASB9* mRNA during follicular development and following hCG injection was analyzed by RT-qPCR. Total RNA was extracted from bovine GC collected from follicles at different developmental stages (SF, DF, OF) and CL, and from follicular walls (granulosa and theca layer cells) collected at 0, 6, 12, 18, and 24 hours post-hCG injection. Specific *ASB9* PCR primers (Table 1) were used and *ASB9* mRNA relative expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method [26] with *GAPDH* as reference gene.

**Table 1.** Primers used in the expression analyses of *Bos taurus* genes by RT-qPCR.

Gene Names		Primer sequence (5'-3')*	Accession no.	AS (bp)
<b>GAPDH</b>	Fwd	tgttcagatgattccaccacg	NM_001034034	703
	Rv	ggttgtctctcgacttcaacag		
<b>HIF1A</b>	Fwd	atgtgaccacgaggaaatgag	NM_174339.3	230
	Rv	tagttctccccggctagtta		
<b>CKB</b>	Fwd	tcgccctcggtagagtttatt	NM_001015613	240
	Rv	actcccttagtgggacccttt		
<b>ASB9</b>	Fwd	tactgcagatcgtgtgtctc	AY438595	165
	Rv	tcttagcagcttcgtggatgg		
<b>PCNA</b>	Fwd	aagccactccactgtctccta	NM_001034494.1	207
	Rv	ttaagtgtgtgctggcatctc		
<b>CYP19A1</b>	Fwd	gaggaggtctgcaatgacttg	NM_174305	167
	Rv	ggtttgagaaggagagcttgc		
<b>CYP11A1</b>	Fwd	gctggcctatcaccgatatta	NM_176644.2	161
	Rv	tgacgaagtctgagacacgt		

**Abbreviations:** AS, amplicon size (base pairs); Fwd, forward primer; Rv, reverse primer.

\*All primers were designed and validated by the authors. Each primer was used at a final concentration of 600 nM.

## **Cell extracts and immunoblotting analysis**

Granulosa cells and follicular wall preparations obtained as described above, were homogenized in M-PER buffer (Pierce, Rockford, IL, USA) supplemented with complete protease inhibitors (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), and centrifuged at 16,000 x g for 10 min at 4°C. The recovered supernatant was stored at -70°C until electrophoretic analyses were performed. Total protein concentrations were determined using the Bradford method [27] (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Lab, Mississauga, ON, Canada). Immunoblotting experiments were performed as described previously [28]. Samples (25µg of proteins) were resolved by one-dimensional denaturing Novex Tris-glycine gels (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; GE Healthcare Life Sciences). Membranes were incubated with specific first antibodies against ASB9 (rabbit polyclonal anti-ASB9, cat.# ab97918, Abcam; at 5 ng/µl final concentration). The immunoreactive proteins were visualized by incubation with appropriate horseradish peroxidase-linked secondary antibodies with the enhanced chemiluminescence system, ECL plus (GE Healthcare Life Sciences), according to the manufacturer's protocol, and followed by revelation using the ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad).

## **Yeast two-hybrid assay**

### **Material and media legend**

The material and media used for the yeast two-hybrid assay have been previously reported [7].

### **ASB9 constructs for bait preparation**

An ASB9 construct was generated by PCR amplification of a 1593 bp-fragment corresponding to the full-length bovine ASB9 (AY438595). The PCR product was purified and cloned in frame to the GAL4-DNA binding domain into the pGBKT7 vector to produce a bait plasmid using the Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) as previously described [7]. The bait plasmid (pGBKT7-ASB9) was used to transform Y2HGold yeast strains and referred to as Y2HGold[pGBKT7-ASB9]. Y2HGold yeast cells harbor four reporter genes (HIS3, ADE2, MEL1 and AUR1) under the control of GAL4 upstream activating sequences,

which are used to detect two-hybrid interactions. Expression of ASB9 protein in yeast cells containing pGBKT7-ASB9 plasmids was verified using anti-ASB9 antibodies in western blot analysis. To confirm that the pGBKT7-ASB9 bait did not autonomously activate the reporter genes in Y2HGold in the absence of a prey protein, competent Y2HGold cells were transformed with pGBKT7-ASB9 and the transformants were plated on appropriated selective agar plates. In parallel, competent Y2HGold cells were transformed separately with pGBKT7-ASB9 and pGBKT7 empty vector (pGBKT7-C) as control to demonstrate that the ASB9 bait protein was not toxic when expressed in yeast cells. All plated yeast cells were incubated at 30°C for 5 days.

### **Generation of GC-cDNA library and construction of the two-hybrid prey library**

A bovine GC-cDNA prey library from ovulatory follicles was prepared in Y187 yeast strain using the pGADT7-Rec vector. cDNAs were expressed as fusion to the GAL4 activating domain using the Matchmaker library construction & screening kit (Clontech User manual PT4085-1) as previously described [7]. Total RNA was isolated from GC of ovulatory follicles and used to generate cDNA with Oligo dT (CDSIII) primers. Competent Y187 yeast cells were prepared and co-transformed with pGADT7-Rec plasmid and cDNAs from GC of ovulatory follicles. The transformed yeast cells, referred to as Y187[pGADT7-GC], were plated, collected after a 5-day incubation at 30°C and stored as previously reported [7].

### **Two-hybrid library screening using yeast mating**

The screening procedure was performed as previously reported by our laboratory [7]. Briefly, Y2HGold yeast cells carrying the bait plasmids (Y2HGold[pGBKT7-ASB9]) were mated with Y187 yeast harboring the bovine GC-cDNA library (Y187[pGADT7-GC]). Target prey plasmids responsible for the activation of reporter genes were rescued, isolated and characterized by sequencing. Nucleic acid sequences were verified for the presence of an open reading frame fused in frame to the GAL4 AD sequence and were compared to those in GenBank.

### **Co-IP confirmation of protein interactions**

Physical interactions between ASB9 and candidate partners were confirmed by in vitro co-immunoprecipitation assay using the Matchmaker Co-IP system (Clontech). Plasmid



constructs containing ASB9 and potential prey partners were used to co-transfect HEK 293 cells using the CalPhos Mammalian transfection kit (Clontech) as recommended by the manufacturer. The potential prey partners tested were tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A) and cytochrome B (CYTB). These partners were selected based on the number of times they were identified and on their potential roles in the ovarian follicle. Cell lysates were prepared as previously described [28]. Physical interactions between ASB9 and prey proteins were validated and quantified using the ProLabel enzyme complementation assay (Clontech). Luminescent signals were recorded every 5 minutes for 45 minutes using a SpectraMax i3 Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices). Relative luminescence units (RLU) were plotted as a function of time in order to quantify the relative importance of protein interactions.

### **Regulation of ASB9 partners during follicular development**

The expression of ASB9 partners was analyzed during follicular development by RT-qPCR using total RNA from SF, DF, OF and CL samples described earlier. Relative mRNA expression of *HIF1A* was quantified by RT-qPCR using specific primers (Table 1), and the results were analyzed using the Livak method [26]. Creatine kinase B expression was also analyzed during follicular development and in ovulatory follicles at different hours post-hCG injection.

### **Functional studies using CRISPR/Cas9 experiments**

To study the function of ASB9 in GC of ovulatory follicles, we used the CRISPR/Cas9 technology through the guide-it CRISPR/Cas9 system (Clontech) for the cloning and expression of target single guide RNAs (sgRNAs) for ASB9 inhibition in GC. Four sgRNAs were designed using online tools to maximize cleavage efficiency at the target site and minimize non-specific cleavage events. The efficiency of designed sgRNAs was tested prior to transfection experiments using the Guide-it sgRNA *in vitro* transcription and Screening System (Clontech). DNA templates containing sgRNA-encoding sequences under the control of T7 promoter were generated by PCR, *in vitro* transcribed, and purified. Cleavage templates for screening the purified sgRNAs were produced by amplification of DNA fragments that contain ASB9

sequence. A cleavage reaction on these templates was performed using the purified sgRNAs with the recombinant Cas9 nuclease (Clontech). The efficiency of cleavage reactions was analyzed on agarose gel followed by densitometry analyses. A sgRNA was identified and used for cloning into the pGuide-it-ZsGreen1 vector for plasmid construct and transfection of GC using the Xfect transfection kit (Clontech). GC were collected from large follicles ( $\geq 8$  mm in diameter) of slaughterhouse ovaries and cultured either in 96-well plates (proliferation assay) or in 24-well plates (gene expression analysis) in DMEM/F12 supplemented with L-glutamine (2 mM), sodium bicarbonate (0.084%), bovine serum albumin (BSA; 0.1%), HEPES (20 mM), sodium selenite (4 ng/ml), transferrin (5  $\mu$ g/ml), insulin (10 ng/ml), non-essential amino acids (1 mM), penicillin (100 IU) and streptomycin (0.1 mg/ml). Transfected GC along with control GC (transfection with empty vector or no transfection) remained in culture for six days with media replacement every two days. Expression of Cas9 protein in GC was confirmed by western blot analysis with anti-Cas9 antibodies and ASB9 gene editing was confirmed through the presence of mutations using a PCR-based analysis kit (Clontech). The effects of CRISPR/Cas9-induced ASB9 inhibition were assessed by measuring GC proliferation and markers for proliferation, specifically analyzing the expression of PCNA and steroidogenic genes CYP19A1 and CYP11a1. We also analyzed the effects of ASB9 silencing on creatine kinase B (CKB) expression in GC.

## Statistical analyses

Relative amounts of *ASB9* and other target genes mRNA were normalized with those of the control gene *GAPDH*. Homogeneity of variance between groups was verified by O'Brien and Brown-Forsythe tests. Corrected values of gene specific mRNA levels were compared between follicular or CL groups by one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA indicated a significant difference ( $P < 0.05$ ), the Tukey-Kramer test was used for multiple comparison of individual means among SF, DF, OF and CL, whereas the Dunnett test ( $P < 0.05$ ) was used to compare different time points after hCG with 0 hour as control. Data were presented as least-square means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad prism 5.0 software.

## Results

### **ASB9 expression in granulosa cells is induced by hCG/LH**

In order to investigate *ASB9* mRNA expression and regulation in bovine follicles, total RNA extracts of bovine GC from small follicles (SF; 2–4 mm in diameter), dominant follicles obtained at day 5 of the estrous cycle (DF), ovulatory follicles isolated 24 hours post-hCG (OF), and corpora lutea obtained at day 5 of the estrous cycle (CL) were analyzed using RT-qPCR. Expression of *ASB9* was significantly increased in ovulatory follicles following hCG injection and reduced to basal levels in SF, DF and CL (Fig 1A;  $P < 0.05$ ). *ASB9* mRNA expression was increased by 104-fold in OF following hCG injection as compared to DF (Fig 1A).

Because *ASB9* transcript was expressed to high amounts in ovulatory follicles, the gonadotropin-dependent regulation of *ASB9* mRNA during the periovulatory period was further investigated in ovulatory follicles using total RNA obtained from follicular walls (theca layer cells with attached granulosa cells) of preovulatory follicles collected at 0, 6, 12, 18 and 24 hours post-hCG injection. The results from RT-qPCR analyses showed a significant induction of *ASB9* expression in follicles at 12 and 18 hours post-hCG (Fig 1B;  $P < 0.05$ ), reaching a maximum induction at 24 hours post-hCG as compared to 0 hour (Fig 1B;  $P < 0.05$ ). This induction of *ASB9* mRNA expression was confirmed with the endogenous luteinizing hormone (LH) surge model showing an upregulation of *ASB9* at 24 hours post LH surge as compared to 0 h (Fig 1D). Furthermore, ASB9 protein expression was investigated by western blot analysis using anti-ASB9 antibodies. Similar to the mRNA expression, results obtained with protein extracts using granulosa cells isolated from ovulatory follicles at 0, 12, 18 and 24 hours after hCG injection showed an induction of ASB9 protein expression at 18 and 24 hours as compared to 0 hour (Fig 1C).

### **Yeast two-hybrid (Y2H) screening revealed potential ASB9 partners in granulosa cells**

To identify ASB9 binding partners in granulosa cells, a yeast two-hybrid screening was performed. The Y2HGold yeast strain were transformed either with pGBKT7 empty vector as control (pGBKT7-C), or the plasmid construct containing ASB9 (pGBKT7-ASB9), and were

spread on selective media to verify for toxicity and autoactivation analyses. The construct pGBKT7-ASB9 was not toxic to the Y2HGold yeast strain and ASB9 did not, by itself, activate the transcription of reporter and selection genes (*AUR-C*, *ADE2*, *HIS3*, and *MEL1*), since no colonies grew when ASB9 construct was plated in the presence of aureobasidin A antibiotic (S1 Fig). To verify that ASB9 protein was expressed in yeast cells, total protein from Y2HGold strain transformed with pGBKT7-ASB9 was used to perform western blot analysis using anti-ASB9 antibodies. Total protein extracts of bovine granulosa cells from two ovulatory follicles isolated 24 hours post-hCG were used as positive controls. Western blot analysis confirmed ASB9 protein expression in the Y2HGold yeast strain (Fig 2).

Finally, mating of the Y2HGold[pGBKT7-ASB9] strain with the Y187[pGADT7-GCcDNA] strain resulted in the presence of zygotes that indicated potential interactions between the bait (ASB9) and prey proteins contained in the ovulatory follicle GC-cDNA library (S2 Fig). A limited number of potentially positive yeast colonies was used to analyze for the presence or absence of a cDNA insert. The presence of a cDNA insert indicates a true positive suggesting a potential partner for ASB9 while the absence of an insert indicates a false positive (S3 Fig). Plasmids from positive colonies were purified from yeast colonies containing an insert, amplified by PCR and sequenced. Sequence analyses showed that yeast two-hybrid screening of ovulatory follicle GC-cDNAs library resulted in the identification of 10 potential ASB9 binding partners in GC, two of which were chosen to be further confirmed (Table 2).

**Table 2.** List of ASB9 binding partners.

Gene Names	Accession #*	Freq.	Ident. (%)	E-value	Description
CYTB	JX472273	4	100	0.0	B.T. Cytochrome b
RGN	NM_173957	1	99	0.0	B.T. Regucalcin
TNFAIP6**	NM_001007813	1	100	7e-154	B.T. TNF alpha induced protein 6
PHLDA1	XM_019960200	1	99	0.0	B.I. Pleckstrin homology like domain family A member 1
HIF1A**	NM_174339	1	93	0.0	B.T. Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha
TUBB4B	NM_001034663	1	99	8e-78	B. T. Tubulin beta 4B class IVb
SLC25A15	NM_001046326	1	95	1e-14	B.T. Solute carrier family 25 member 15
TAOK1	XM_024980290	1	99	0.0	B.T. TAO kinase 1
GLOD4	XM_019980727	1	88	5e-84	B.I. Glyoxalase domain containing 4
GATD3A	NM_001034463	2	99	0.0	B.T. Glutamine amidotransferase like class 1 domain containing 3A

Plasmids were purified from true positive yeast colonies, amplified by PCR and sequenced.

Sequences were analyzed for identity and resulted in 10 different proteins potentially interacting with ASB9.

**Freq.:** Frequency of cDNA clone identification from yeast two-hybrid prey library

**Ident. (%):** Represents homology estimates of bovine prey cDNA fragments with nucleotide sequences in GenBank database; B.T.: *Bos taurus*; B.I.: *Bos indicus*.

\* Accession number of the best match found following nucleotide sequence comparison via BLAST search in GenBank.

\*\* Partners whose physical interactions with ASB9 were confirmed by co-immunoprecipitation assays.

## **ASB9 physically interacts with TNFAIP6 and HIF1A**

Included in the group of ASB9 binding partners are tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6) and hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A). In order to further confirm yeast two-hybrid results in a mammalian cell model, physical interactions between ASB9 and candidate partners were investigated by in vitro co-immunoprecipitation followed by ProLabel enzyme complementation assay in HEK 293 cells. Using the ProLabel enzyme complementation assay, relative chemiluminescent signals (RLU) of TNFAIP6 and HIF1A were compared to a reference positive interaction, an experimental control and a negative control. Similar to the positive control, TNFAIP6 and HIF1A RLU signals were significantly increased as compared to the experimental and negative controls, confirming a physical interaction with ASB9 (Fig 3). After 40 minutes of incubation with the substrate, induction of ProLabel enzymatic activity in HEK cells co-transfected with ASB9/TNFAIP6 or ASB9/HIF1A increased, respectively, by 18- and 13-fold as compared to the negative control (Fig 3). As reference, induction of ProLabel enzymatic activity increased in the positive control by 37-fold.

## **ASB9 partners are differentially regulated during follicular development**

In order to investigate the regulation of ASB9 binding partners expression during follicular development, total RNA extracts of bovine granulosa cells from small follicles (SF), day 5-dominant follicles (DF), ovulatory follicles isolated 24 hours post-hCG (OF), and day 5-corpora lutea (CL) were analyzed by RT-qPCR for *HIF1A* using specific primers. From SF to DF, *HIF1A* mRNA expression was increased by 2.86-fold (Fig 4;  $P < 0.05$ ) and remained similarly strong in the OF before decreasing significantly in the CL as compared to DF and OF (Fig 4;  $P < 0.05$ ). Significant induction of *TNFAIP6* mRNA expression in OF has already been clearly demonstrated in previous work [29, 30].

Since previous studies have shown interaction between ASB9 and brain type creatine kinase (CKB) [17-20] and no interaction between these two proteins was identified in granulosa cells from our yeast two-hybrid screening, we decided to analyze *CKB* expression during follicular development and verify its expression in granulosa cells as compared to that of *ASB9*. Steady-state mRNA expression of *CKB* was strongest in the CL at day 5 of the estrous cycle as compared to all stages of follicular development (Fig 5A;  $P < 0.05$ ) while *ASB9* expression was

strongest in ovulatory follicles (Fig 1A). In addition, *CKB* expression post-hCG injection showed an increase 6 hours post-hCG and a rapid decline at 12 hours post-hCG and remained low through 24 hours post-hCG (Fig 5B). In contrast, *ASB9* expression was strongest 24 hours post-hCG and weakest at 0 and 6 hours post-hCG (Fig 1B).

### **Functional studies using CRISPR-Cas9**

Four sgRNA sequences were synthesized and tested against *ASB9* sequence from GC. A sgRNA with 97.4% efficiency at directing Cas9-mediated cleavage of *ASB9* was identified (Fig 6). This sgRNA was used for cloning into the pGuide-it vector for plasmid construct and transfection of bovine GC.

Effects of *ASB9* silencing on cell proliferation and target genes expression were analyzed. Results showed that *ASB9* silencing led to significant increase in GC proliferation (Fig 7;  $P < 0.05$ ). In addition, Proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) expression was significantly increased in GC when *ASB9* was inhibited using CRISPR/Cas9 (Fig 8). *PCNA* was used to assess and confirm GC proliferation since it is expressed in the nuclei of cells during the DNA synthesis phase of the cell cycle. To verify the effects of *ASB* silencing in steroidogenesis, expression of *CYP19A1* and *CYP11A1* were analyzed. Expression of *CYP19A1* expression was not affected by *ASB9* inhibition while *CYP11A1* expression was significantly increased when *ASB9* was inhibited. Finally, there was no significant changes in *CKB* expression following *ASB9* inhibition.

## Discussion

During follicular development, granulosa cells along with theca cells and oocyte, exhibit a series of functional changes in terms of gene activation or inhibition. Granulosa cells become more responsive to FSH and show a higher rate of proliferation once a dominant follicle is selected [3, 4, 7], while the preovulatory follicle displays an array of genes induced by the LH surge or hCG injection [8, 29, 31]. In this study, we report for the first time ASB9 regulation and protein interactions in the reproductive system using granulosa cells from bovine ovarian follicles. Our results show that ASB9 expression is hormonally-regulated as it is significantly induced by the endogenous LH surge and by hCG injection in a time-dependent manner. The greatest expression of ASB9 was found in the ovulatory follicle 24 hours post-hCG injection both at the mRNA and protein levels. It is known that ASB9 is involved in the pathway of protein ubiquitination, which is part of protein modification and thus acts as a ubiquitin ligase controlling the abundance of target proteins [18, 20]. Because ASB9 expression in the OF is considerably induced as compared to the growing dominant follicle, it is conceivable that ASB9 might play a role in the ovulatory process and extracellular matrix remodeling by targeting specific proteins for binding and degradation. In fact, in this study, inhibition of ASB9 expression in granulosa cells using CRISPR-Cas9 leads to increased granulosa cell proliferation and modulated specific genes expression including steroidogenic gene CYP11A1. These observations indicate that ASB9 might be associated with controlling the activity of target genes involved in the ovulatory follicle immediately prior to ovulation. These observations could also suggest that ASB9 is involved in granulosa cells differentiation into luteal cells similar to its perceived role in mouse spermatogenesis [22].

Ankyrin repeat and SOCS Box proteins interact with a wide variety of target substrates via ankyrin repeat domains [16-18]. In addition, members of ASB protein family can interact with the elongin B-C adapter complex via their SOCS box domain and further complex with the cullin and ring box proteins to form E3 ubiquitin ligase complexes and participate in protein degradation [10, 20, 32]. Thus, SOCS proteins regulate protein turnover by targeting proteins for polyubiquitination and proteasome-mediated degradation. To our knowledge, no interaction or function of ASB9 has been reported in granulosa cells of any species. Using a yeast two-hybrid screening, we identified and confirmed novel ASB9-interacting proteins in granulosa



cells of ovarian follicles that could be targeted by ASB9 in the ovulatory follicle most likely through the pathway of protein ubiquitination. The association between ASB9 and its binding partners could then lead to degradation of target proteins resulting in gene expression changes and possibly contributing to differentiation of steroidogenic cells into luteal cells after ovulation. We identified 10 individual potential partners for ASB9 in bovine granulosa cells, some of which are known to be expressed in ovulatory follicles and participate actively in the ovulation process. Of interest, we showed that TNFAIP6 and HIFA1 interact with ASB9 in granulosa cells.

Tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), also known as Tumor necrosis factor-stimulated gene 6 (TSG6), is a secretory protein that contains a hyaluronan-binding domain known to be involved in extracellular matrix (ECM) stability and cell migration [33, 34]. TNFAIP6 has been shown to form a stable complex with inter- $\alpha$ -inhibitor to enhance the serine protease inhibitory activity of inter- $\alpha$ -inhibitor, which is important in the protease network associated with inflammation [35]. TNFAIP6 can also be induced by proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 [36, 37]. Moreover, enhanced levels of TNFAIP6 are found in the synovial fluid of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis [35, 38-40]. It is well established that the ovulation process shares numerous signs of an acute inflammatory reaction [41]. It is therefore consistent that TNFAIP6 expression increases during ovulation process. The preovulatory endogenous LH surge or hCG injection induces the expression of several genes involved in the ovulatory process including TNFAIP6, which is highly induced in follicular cells of rodents and mare [41-45]. Several studies have documented the crucial role of TNFAIP6 in ECM production, cumulus expansion and fertility [42, 46-48]. A previous study also provided evidence for a marked induction of TNFAIP6 by gonadotropins in follicular cells before the rupture of the follicle in cows [29]. Ovulation also involves a series of events such as ECM formation and cumulus-oocyte complex (COC) expansion leading to the rupture of the preovulatory follicle and release of the oocyte [49, 50]. ASB9 binding to TNFAIP6 could be a regulatory mechanism to facilitate the follicle's rupture and transition to luteinisation. Although TNFAIP6 could be targeted by ASB9, likely for degradation by the proteasome, the mechanism by which ASB9 binds to TNFAIP6 remains unclear. Furthermore, TNFAIP6 targeting by ASB9 likely occurs right before ovulation, which

in the cow occurs around 28 hours post-LH or post-hCG as previously reported [51] and when ASB9 expression is strongest and when TNFAIP6 activity is no longer required for ECM stability or COC expansion. It has been shown in bovine granulosa cells that TNFAIP6 expression dramatically increased at the 6-hour point post-LH and significantly decreased at 22 hours post-LH [52]. Another study, also using bovine granulosa cells, showed a significant induction of TNFAIP6 expression 6 hours post-hCG with the strongest induction at 12 hours post-hCG, although this induction remains strong through 24 hours post-hCG [29]. Both studies suggest a crucial action of TNFAIP6 between 6 and 12 hours post-LH/hCG, suggesting that at 24 hours post-LH/hCG, TNFAIP6 activity could be regulated by ASB9 possibly through ubiquitination and degradation. Induction of various genes by LH/hCG in the preovulatory period varies greatly as shown in bovine and rats [8, 53, 54]. Additionally, ASB9 and TNFAIP6 peak expressions seem to occur at different times after the LH surge or hCG injection suggesting that ASB9 would bind TNFAIP6 only after the latter has participated in critical ovulatory steps.

The second binding partner whose interaction with ASB9 was confirmed is HIF1A. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF1) is a heterodimer and a member of the basic-Helix-Loop-Helix-PAS family of transcription factors composed of an alpha and beta subunits [55]. In mammals, HIFs function as regulators of cellular and systemic homeostatic response to hypoxia by activating transcription of many genes whose protein products increase oxygen delivery or facilitate metabolic adaptation to hypoxia [56]. HIF1 activity is controlled by the oxygen-regulated expression of the alpha (HIF1A) subunit. Under normal conditions, HIF1A is subject to ubiquitination and proteasomal degradation but is stabilized by hypoxia [56-58]. Previous studies have shown that HIF1A is activated in FSH-stimulated ovarian cancer cells SKOV-3 [59], as well as in mouse granulosa cells where HIF1A was shown to be an inducible factor after FSH treatment *in vivo* and *in vitro* [60]. In the ovary, excessive cell proliferation induced by gonadotropins promotes the accumulation of HIF1A and leads to hypoxia [61]. In contrast, inhibition of the HIF transcriptional activity suppresses the binding of HIF  $\alpha\beta$ -heterodimers to target genes and blocks ovulation by preventing the rupture of the preovulatory follicles [62]. In our study, we showed that HIF1A expression in granulosa cells was strongest in the growing dominant follicle and remained strong in the ovulatory follicle before declining in the CL. The strong presence of HIF1A in the dominant follicle is consistent with its accumulation associated

with proliferation of granulosa cells in the selected dominant or pre-ovulatory follicle. In contrast, it is possible that the LH surge or hCG injection creates a hypoxic condition within the ovulatory follicle leading to enhanced HIF1A expression during ovulation. Increased expression of HIF1A during the ovulatory period may occur due to enhanced hypoxia-induced stability of HIF1A as suggested previously [62]. However, ASB9 would eventually target HIF1A for degradation as steroidogenic cells are transitioning from a proliferative state to a final state of differentiation into luteal cells.

ASB9 has been shown to bind to and ubiquitinate brain-type cytosolic creatine kinase (CKB) [18, 20, 63] and ubiquitous mitochondrial creatine kinase (uMtCK) [32, 64]. Interaction between ASB9 and CKB resulted in the SOCS box-dependent ubiquitination and proteasomal degradation of CKB while ASB9 overexpression dramatically reduced endogenous CKB protein [20] and negatively regulates cell growth [32]. In the present study, interaction between ASB9 and CKB was not found in granulosa cells with the application of the yeast two-hybrid screening. For ASB9 to interact with CKB in GC, we reasoned that the two proteins must be expressed at the same stage during follicular development. We have shown that CKB expression in GC is weak throughout the final stages of follicular development from small antral follicles to ovulatory follicles as compared to corpus luteum and at 6 hours post-hCG. In contrast, ASB9 was significantly induced by LH/hCG in preovulatory follicles with the strongest expression 24 hours post-hCG and was dramatically reduced in the CL. In rat ovary, although CKB activity was shown to be present throughout follicular development and luteinisation, it was found to be concentrated in the steroidogenic thecal and luteal cells of the ovary and to a much smaller extent in the granulosa [65]. It is therefore conceivable that interaction between ASB9 and CKB proteins is minimized due to their different temporal expression pattern in relation to the physiological status of the granulosa cells.

## **Conclusion**

In this study, we demonstrated induction of ASB9 in granulosa cells of bovine ovulatory follicles and identified 10 potential binding partners for ASB9 including TNFAIP6 and HIF1A, which were further analyzed. However, there was no interaction between ASB9 and CKB in GC although CKB was shown as a target of ASB9 in other cell types. These data suggest a role of ASB9 in regulating the activity of target proteins likely by ubiquitination and proteasomal degradation. Using CRISPR-Cas9 approach, we showed that ASB9 inhibition leads to increased GC proliferation and may affect GC function by altering specific genes expression. Together, these results support a crucial role for ASB9 following hCG injection or the pituitary LH surge in the events leading up to ovulation and in the process of GC differentiation into luteal cells.

## References

1. Knight PG, Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*. 2001;121(4):503-12. PubMed PMID: 11277869.
2. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(5):2890-4. doi: 10.1073/pnas.052658699. PubMed PMID: 11867735; PubMed Central PMCID: PMC122443.
3. 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. *Biology of reproduction*. 2005;73(2):324-33. Epub 2005/04/15. doi: 10.1095/biolreprod.104.038026. PubMed PMID: 15829623.
4. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*. 2001;122(2):215-26. PubMed PMID: 11467972.
5. Richards JS, Ascoli M. Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2018;29(5):313-25. Epub 2018/04/01. doi: 10.1016/j.tem.2018.02.012. PubMed PMID: 29602523.
6. Ndiaye K, Carriere PD, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. Differential expression of lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) in granulosa cells of ovarian follicles and in other bovine tissues. *J Ovarian Res*. 2015;8(1):12. doi: 10.1186/s13048-015-0148-0. PubMed PMID: 25881887; PubMed Central PMCID: PMC4387681.
7. Ndiaye K, Castonguay A, Benoit G, Silversides DW, Lussier JG. Differential regulation of Janus kinase 3 (JAK3) in bovine preovulatory follicles and identification of JAK3 interacting proteins in granulosa cells. *J Ovarian Res*. 2016;9(1):71. doi: 10.1186/s13048-016-0280-5. PubMed PMID: 27793176; PubMed Central PMCID: PMC5086056.
8. Lussier JG, Diouf MN, Levesque V, Sirois J, Ndiaye K. Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2017;15(1):88. Epub 2017/11/05. doi:

10.1186/s12958-017-0306-x. PubMed PMID: 29100496; PubMed Central PMCID: PMC5670713.

9. Kile BT, Metcalf D, Mifsud S, DiRago L, Nicola NA, Hilton DJ, et al. Functional analysis of Asb-1 using genetic modification in mice. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(18):6189-97. Epub 2001/08/18. PubMed PMID: 11509662; PubMed Central PMCID: PMC87336.

10. Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(5):235-41. Epub 2002/06/22. PubMed PMID: 12076535.

11. Piessevaux J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J. The many faces of the SOCS box. *Cytokine & growth factor reviews*. 2008;19(5-6):371-81. Epub 2008/10/25. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.08.006. PubMed PMID: 18948053.

12. Linossi EM, Nicholson SE. The SOCS box-adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. *IUBMB life*. 2012;64(4):316-23. Epub 2012/03/01. doi: 10.1002/iub.1011. PubMed PMID: 22362562.

13. Kohroki J, Nishiyama T, Nakamura T, Masuho Y. ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. *FEBS Lett*. 2005;579(30):6796-802. Epub 2005/12/06. doi: 10.1016/j.febslet.2005.11.016. PubMed PMID: 16325183.

14. Thomas JC, Matak-Vinkovic D, Van Molle I, Ciulli A. Multimeric complexes among ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9), ElonginBC, and Cullin 5: insights into the structure and assembly of ECS-type Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *Biochemistry*. 2013;52(31):5236-46. Epub 2013/07/11. doi: 10.1021/bi400758h. PubMed PMID: 23837592; PubMed Central PMCID: PMC3756526.

15. Muniz JR, Guo K, Kershaw NJ, Ayinampudi V, von Delft F, Babon JJ, et al. Molecular architecture of the ankyrin SOCS box family of Cul5-dependent E3 ubiquitin ligases. *J Mol Biol*. 2013;425(17):3166-77. Epub 2013/06/29. doi: 10.1016/j.jmb.2013.06.015. PubMed PMID: 23806657; PubMed Central PMCID: PMC3779351.

16. Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in biochemical sciences*. 1999;24(8):311-6. Epub 1999/08/04. PubMed PMID: 10431175.
17. Fei X, Gu X, Fan S, Yang Z, Li F, Zhang C, et al. Crystal structure of Human ASB9-2 and substrate-recognition of CKB. *Protein J*. 2012;31(4):275-84. Epub 2012/03/16. doi: 10.1007/s10930-012-9401-1. PubMed PMID: 22418839.
18. Balasubramaniam D, Schiffer J, Parnell J, Mir SP, Amaro RE, Komives EA. How the ankyrin and SOCS box protein, ASB9, binds to creatine kinase. *Biochemistry*. 2015;54(8):1673-80. Epub 2015/02/06. doi: 10.1021/bi501420n. PubMed PMID: 25654263; PubMed Central PMCID: PMC4348336.
19. Andresen CA, Smedegaard S, Sylvestersen KB, Svensson C, Iglesias-Gato D, Cazzamali G, et al. Protein interaction screening for the ankyrin repeats and suppressor of cytokine signaling (SOCS) box (ASB) family identify Asb11 as a novel endoplasmic reticulum resident ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(4):2043-54. Epub 2013/12/18. doi: 10.1074/jbc.M113.534602. PubMed PMID: 24337577; PubMed Central PMCID: PMC3900953.
20. Debrincat MA, Zhang JG, Willson TA, Silke J, Connolly LM, Simpson RJ, et al. Ankyrin repeat and suppressors of cytokine signaling box protein asb-9 targets creatine kinase B for degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(7):4728-37. Epub 2006/12/07. doi: 10.1074/jbc.M609164200. PubMed PMID: 17148442.
21. Mahajan VB, Pai KS, Lau A, Cunningham DD. Creatine kinase, an ATP-generating enzyme, is required for thrombin receptor signaling to the cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(22):12062-7. doi: 10.1073/pnas.97.22.12062. PubMed PMID: 11050237; PubMed Central PMCID: PMC17294.
22. Lee MR, Kim SK, Kim JS, Rhim SY, Kim KS. Expression of murine Asb-9 during mouse spermatogenesis. *Molecules and cells*. 2008;26(6):621-4. Epub 2008/09/09. PubMed PMID: 18776735.

23. Tokuoka M, Miyoshi N, Hitora T, Mimori K, Tanaka F, Shibata K, et al. Clinical significance of ASB9 in human colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2010;37(5):1105-11. Epub 2010/09/30. PubMed PMID: 20878058.
24. Zhong L, Ge K, Zu JC, Zhao LH, Shen WK, Wang JF, et al. Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R40. Epub 2008/05/08. doi: 10.1186/bcr2091. PubMed PMID: 18460216; PubMed Central PMCID: PMCPMC2481487.
25. Fillion 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. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(36):34323-30. Epub 2001/07/13. doi: 10.1074/jbc.M103709200. PubMed PMID: 11448962.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976;72:248-54. PubMed PMID: 942051.
28. 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. *Molecular reproduction and development.* 2003;64(2):152-65. Epub 2002/12/31. doi: 10.1002/mrd.10239. PubMed PMID: 12506347.
29. Sayasith K, Bouchard N, Dore M, Sirois J. Regulation of bovine tumor necrosis factor-alpha-induced protein 6 in ovarian follicles during the ovulatory process and promoter activation in granulosa cells. *Endocrinology.* 2008;149(12):6213-25. Epub 2008/08/09. doi: 10.1210/en.2008-0459. PubMed PMID: 18687781.
30. Lussier JG, Diouf MN, Levesque V, Sirois J, Ndiaye K. Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 2017;15(1):88. Epub 2017/11/05. doi: 10.1186/s12958-017-0306-x. PubMed PMID: 29100496; PubMed Central PMCID: PMCPMC5670713.



31. Sayasith K, Sirois J, Lussier JG. Expression, regulation, and promoter activation of Vanin-2 (VNN2) in bovine follicles prior to ovulation. *Biology of reproduction*. 2013;89(4):98. Epub 2013/09/06. doi: 10.1095/biolreprod.113.111849. PubMed PMID: 24006283.
32. Kwon S, Kim D, Rhee JW, Park JA, Kim DW, Kim DS, et al. ASB9 interacts with ubiquitous mitochondrial creatine kinase and inhibits mitochondrial function. *BMC biology*. 2010;8:23. Epub 2010/03/23. doi: 10.1186/1741-7007-8-23. PubMed PMID: 20302626; PubMed Central PMCID: PMC2852384.
33. Lee TH, Wisniewski HG, Vilcek J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *The Journal of cell biology*. 1992;116(2):545-57. Epub 1992/01/01. PubMed PMID: 1730767; PubMed Central PMCID: PMCPMC2289279.
34. Lesley J, Gal I, Mahoney DJ, Cordell MR, Rugg MS, Hyman R, et al. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(24):25745-54. Epub 2004/04/03. doi: 10.1074/jbc.M313319200. PubMed PMID: 15060082.
35. Nagyeri G, Radacs M, Ghassemi-Nejad S, Tryniszewska B, Olasz K, Hutás G, et al. TSG-6 protein, a negative regulator of inflammatory arthritis, forms a ternary complex with murine mast cell tryptases and heparin. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(26):23559-69. Epub 2011/05/14. doi: 10.1074/jbc.M111.222026. PubMed PMID: 21566135; PubMed Central PMCID: PMCPMC3123119.
36. Lee TH, Klampfer L, Shows TB, Vilcek J. Transcriptional regulation of TSG6, a tumor necrosis factor- and interleukin-1-inducible primary response gene coding for a secreted hyaluronan-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(9):6154-60. Epub 1993/03/25. PubMed PMID: 8454591.
37. Milner CM, Day AJ. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 10):1863-73. Epub 2003/04/15. doi: 10.1242/jcs.00407. PubMed PMID: 12692188.
38. Klampfer L, Lee TH, Hsu W, Vilcek J, Chen-Kiang S. NF-IL6 and AP-1 cooperatively modulate the activation of the TSG-6 gene by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1.

Molecular and cellular biology. 1994;14(10):6561-9. Epub 1994/10/01. PubMed PMID: 7935377; PubMed Central PMCID: PMC359186.

39. Bayliss MT, Howat SL, Dudhia J, Murphy JM, Barry FP, Edwards JC, et al. Up-regulation and differential expression of the hyaluronan-binding protein TSG-6 in cartilage and synovium in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9(1):42-8. Epub 2001/02/17. doi: 10.1053/joca.2000.0348. PubMed PMID: 11178946.

40. Milner CM, Higman VA, Day AJ. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 3):446-50. Epub 2006/05/20. doi: 10.1042/BST0340446. PubMed PMID: 16709183.

41. Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biology of reproduction*. 1980;22(1):73-106. PubMed PMID: 6991013.

42. Fulop C, Kamath RV, Li Y, Otto JM, Salustri A, Olsen BR, et al. Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene*. 1997;202(1-2):95-102. Epub 1998/01/14. PubMed PMID: 9427551.

43. Yoshioka S, Ochsner S, Russell DL, Ujioka T, Fujii S, Richards JS, et al. Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Endocrinology*. 2000;141(11):4114-9. Epub 2000/11/23. doi: 10.1210/endo.141.11.7784. PubMed PMID: 11089543.

44. Sayasith K, Dore M, Sirois J. Molecular characterization of tumor necrosis alpha-induced protein 6 and its human chorionic gonadotropin-dependent induction in theca and mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. *Reproduction*. 2007;133(1):135-45. Epub 2007/01/25. doi: 10.1530/rep.1.01200. PubMed PMID: 17244740.

45. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 2004;303(5658):682-4. Epub 2004/01/17. doi: 10.1126/science.1092463. PubMed PMID: 14726596.

46. Wisniewski HG, Hua JC, Poppers DM, Naime D, Vilcek J, Cronstein BN. TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a

strong anti-inflammatory effect in vivo. *Journal of immunology*. 1996;156(4):1609-15. Epub 1996/02/15. PubMed PMID: 8568267.

47. Mukhopadhyay D, Hascall VC, Day AJ, Salustri A, Fulop C. Two distinct populations of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 protein in the extracellular matrix of expanded mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001;394(2):173-81. Epub 2001/10/12. doi: 10.1006/abbi.2001.2552. PubMed PMID: 11594731.

48. Fulop C, Szanto S, Mukhopadhyay D, Bardos T, Kamath RV, Rugg MS, et al. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*. 2003;130(10):2253-61. Epub 2003/04/02. PubMed PMID: 12668637.

49. Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Human reproduction update*. 1999;5(4):293-301. Epub 1999/08/28. PubMed PMID: 10465521.

50. Zhuo L, Kimata K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct*. 2001;26(4):189-96. Epub 2001/11/09. PubMed PMID: 11699635.

51. Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Dore M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human reproduction update*. 2004;10(5):373-85. Epub 2004/06/19. doi: 10.1093/humupd/dmh032. PubMed PMID: 15205395.

52. Gilbert I, Robert C, Dieleman S, Blondin P, Sirard MA. Transcriptional effect of the LH surge in bovine granulosa cells during the peri-ovulation period. *Reproduction*. 2011;141(2):193-205. Epub 2010/12/03. doi: 10.1530/REP-10-0381. PubMed PMID: 21123518.

53. Espey LL, Richards JS. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biology of reproduction*. 2002;67(6):1662-70. Epub 2002/11/22. PubMed PMID: 12444039.

54. Christenson LK, Gunewardena S, Hong X, Spitschak M, Baufeld A, Vanselow J. Research resource: preovulatory LH surge effects on follicular theca and granulosa

transcriptomes. *Molecular endocrinology*. 2013;27(7):1153-71. doi: 10.1210/me.2013-1093. PubMed PMID: 23716604; PubMed Central PMCID: PMC3706842.

55. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5510-4. Epub 1995/06/06. PubMed PMID: 7539918; PubMed Central PMCID: PMCPMC41725.

56. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-5. Epub 1999/06/03. doi: 10.1038/20459. PubMed PMID: 10353251.

57. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(9):4748-53. Epub 2000/04/12. doi: 10.1073/pnas.080072497. PubMed PMID: 10758161; PubMed Central PMCID: PMCPMC18304.

58. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*. 2001;292(5516):464-8. Epub 2001/04/09. doi: 10.1126/science.1059817. PubMed PMID: 11292862.

59. Huang Y, Hua K, Zhou X, Jin H, Chen X, Lu X, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway mediates FSH-stimulated VEGF expression in ovarian serous cystadenocarcinoma. *Cell research*. 2008;18(7):780-91. Epub 2008/06/25. doi: 10.1038/cr.2008.70. PubMed PMID: 18574502.

60. Zhou J, Yao W, Li C, Wu W, Li Q, Liu H. Administration of follicle-stimulating hormone induces autophagy via upregulation of HIF-1alpha in mouse granulosa cells. *Cell Death Dis*. 2017;8(8):e3001. Epub 2017/08/18. doi: 10.1038/cddis.2017.371. PubMed PMID: 28817115; PubMed Central PMCID: PMCPMC5596559.

61. Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Lee EJ, Ashcroft M, et al. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of

hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 2009;150(2):915-28. Epub 2008/10/11. doi: 10.1210/en.2008-0850. PubMed PMID: 18845636; PubMed Central PMCID: PMCPMC2646536.

62. Kim J, Bagchi IC, Bagchi MK. Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice. *Endocrinology*. 2009;150(7):3392-400. Epub 2009/03/28. doi: 10.1210/en.2008-0948. PubMed PMID: 19325003; PubMed Central PMCID: PMCPMC2703551.

63. Schiffer JM, Malmstrom RD, Parnell J, Ramirez-Sarmiento C, Reyes J, Amaro RE, et al. Model of the Ankyrin and SOCS Box Protein, ASB9, E3 Ligase Reveals a Mechanism for Dynamic Ubiquitin Transfer. *Structure*. 2016;24(8):1248-56. Epub 2016/07/12. doi: 10.1016/j.str.2016.05.016. PubMed PMID: 27396830; PubMed Central PMCID: PMCPMC4972691.

64. Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, et al. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;134(9):2189-98. Epub 2013/11/01. doi: 10.1002/ijc.28547. PubMed PMID: 24174293.

65. Naumoff PA, Stevenson PM. Creatine kinase, steroidogenesis and the developing ovarian follicle. *Int J Biochem*. 1985;17(12):1363-7. Epub 1985/01/01. PubMed PMID: 4092817.

## Figures Legends

### Figure 1. ASB9 expression and regulation in bovine granulosa cells.

**A)** Total RNA extracts of bovine granulosa cells from small follicles (SF; 2–4 mm in diameter; n=three pools of 20 follicles), dominant follicles obtained at Day 5 of the estrous cycle (DF; n=4 animals), ovulatory follicles isolated 24 hours post-hCG (OF; n=4 animals), and corpora lutea obtained at Day 5 of the estrous cycle (CL n=3 animals) were analyzed by RT-qPCR for *ASB9* and *GAPDH* (used as reference gene) mRNA expression. **B)** Similarly, total RNA from bovine follicular walls (theca layer cells with attached granulosa cells) were isolated from OF at 0, 6, 12, 18 and 24 hours post-hCG injection (n=2 animals per time point) and analyzed by RT-qPCR. *ASB9* relative amounts were normalized with respect to *GAPDH* and presented as least-square means  $\pm$  SEM. **A)** *ASB9* mRNA expression was increased by 104-fold in OF as compared to DF. **B)** Further analyses showed a significant induction of *ASB9* expression in follicular walls at 12 and 18 hours, reaching a maximum induction at 24 hours post-hCG injection as compared to 0 hours. **C)** Total protein extracts of bovine granulosa cells isolated from OF at 0, 12, 18, and 24 hours post-hCG injection were analyzed by western blot using anti-*ASB9* antibodies. hCG induced *ASB9* protein expression starting at 12 hours with the strongest expression observed at 24 hours post-hCG, reflecting the regulation of the mRNA. **D)** Gel analysis of *ASB9* mRNA regulation by endogenous LH. Similar to hCG, induction of *ASB9* expression was observed 24 hours after the endogenous LH surge as compared to 0 hour. Different letters denote samples that differ significantly ( $P < 0.05$ ). Bars marked with an asterisk are significantly different from 0 hour ( $P < 0.05$ ).

### Figure 2. Confirmation of ASB9 expression in yeast cells.

Y2HGold yeast strain was transformed with the construct pGBKT7-*ASB9*. An overnight culture was used to extract protein and perform western blot analysis using anti-*ASB9* antibodies. Total protein extracts of bovine granulosa cells from two ovulatory follicles isolated 24 hours post-hCG (OF1 and OF2) were used as positive controls. Results confirmed *ASB9* expression in the Y2HGold yeast strain.

**Figure 3. Chemiluminescence analyses and confirmation of ASB9 protein interaction with TNFAIP6 and HIF1A.**

ASB9 bait was cloned into the pAcGFP1-C vector and the prey partners from OF granulosa cell library (tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 [TNFAIP6] and hypoxia inducible factor 1, alpha subunit [HIF1A]) were cloned, separately, into the pProLabel-C vector for co-transfection of HEK 293 cells. After co-expression and protein extraction, co-immunoprecipitations using protein G Plus/A agarose beads were followed by chemiluminescence analyses. Using the ProLabel enzyme complementation assay, luminescent signals (expressed in relative luminescent unit [RLU]) of TNFAIP6 and HIF1A were compared to a positive interaction (Pos. ctl) consisting of pAcGFP1-53 and ProLabel-T, to an experimental control (Exp. ctl) consisting of pAcGFP1-ASB9 and ProLabel-empty vector, and a negative control (Neg. ctl). TNFAIP6 and HIF1A RLU were significantly increased as compared to the experimental and negative controls confirming a real physical interaction. After 40 minutes of the substrate addition, there was 18-fold and 13-fold induction in ProLabel enzymatic activity in HEK cells co-transfected, respectively, with ASB9/TNFAIP6 and ASB9/HIF1A as compared to the experimental control.

**Figure 4 *HIF1A* mRNA expression in bovine granulosa cells.**

Total RNA extracts of bovine granulosa cells from small follicles (SF n=3), dominant follicles obtained at Day 5 of the estrous cycle (DF n=4), ovulatory follicles isolated 24 hours post-hCG (OF n=4), and corpora lutea obtained at Day 5 of the estrous cycle (CL n=3) were analyzed by RT-qPCR for *HIF1A* and *GAPDH* (as reference gene) mRNA expression. *HIF1A* relative amounts were normalized with respect to *GAPDH*, and the results are presented as least-square means  $\pm$  SEM. Steady-state mRNA expression of *HIF1A* was increased by 2.86-fold in DF as compared to SF and remained strong in the OF before declining in the CL. Different letters denote samples that differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Figure 5 *CKB* mRNA expression in bovine granulosa cells.**

A) Total RNA extracts of bovine granulosa cells from small follicles (SF; n=3), day 5-dominant follicles (DF; n=4), 24 hours post-hCG-ovulatory follicles (OF; n=4), and day 5-corpora lutea (CL n=3) were analyzed by RT-qPCR for *CKB* and *GAPDH* mRNA expression. *CKB* relative

amounts were normalized with respect to *GAPDH* and results are presented as least-square means  $\pm$  SEM. *CKB* mRNA expression was significantly stronger in the CL as compared to all stages of follicular development. **B)** Total RNA from bovine follicular walls were isolated from OF at 0, 6, 12, 18 and 24 hours post-hCG injection (n=2 per time point) and analyzed by RT-qPCR. Analyses showed an increase in *CKB* expression in follicular walls at 6 hours post-hCG as compared to 0 hour. However, *CKB* expression rapidly declined starting at 12 hours post-hCG through 24 hours post-hCG. Different letters denote samples that differ significantly (P<0.05).

**Figure 6 Design and identification of an efficient sgRNA.**

Four sgRNA sequences were synthesized and tested against ASB9 sequence from GC. The efficiency of cleavage reactions was analyzed on agarose gel and by densitometry. A sgRNA with 97.4% efficiency at directing Cas9-mediated cleavage of ASB9 mRNA was identified. L: 100 bp ladder; lane 1: uncleaved ASB9 fragment; Lane 2: Cleaved fragments. sgRNAs with lower efficiencies are not shown.

**Figure 7. Proliferation assay of GC with CRISPR-Cas9-induced ASB9 inhibition.**

Bovine GC collected from large follicles were cultured in DMEM/F12 as described in materials and methods. GC were seeded in 96-well plates and incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub> and proliferation was determined using the CellTiter assay kit (Promega). The CellTiter substrate was added for 3 hours before measuring absorbance at 490 nm with the SpectraMax i3 (Molecular Devices). Inhibition of ASB9 significantly increased GC proliferation (P<0.05).

**Figure 8. mRNA expression of PCNA, *CYP19A1*, *CYP11A1* and *CKB* in ASB9-inhibited GC.**

Total RNA was extracted from cultured GC following CRISPR-Cas9-induced inhibition of ASB9 and control GC. Samples were analyzed by RT-Qpcr for *PCNA*, *CYP19A1*, *CYP11A1* and *CKB* Mrna expression and relative amounts were normalized with *GAPDH*. *PCNA* expression significantly increased in CRISPR/Cas9-induced inhibition of ASB9 (-1.12-fold; Fig. 8). Steroidogenic gene *CYP19A1* expression was not affected by ASB9 inhibition while *CYP11A1* expression was significantly increased when ASB9 was inhibited (1.28-fold). There



were no significant changes in *CKB* expression following ASB9 inhibition. Different letters denote samples that differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Figure 1

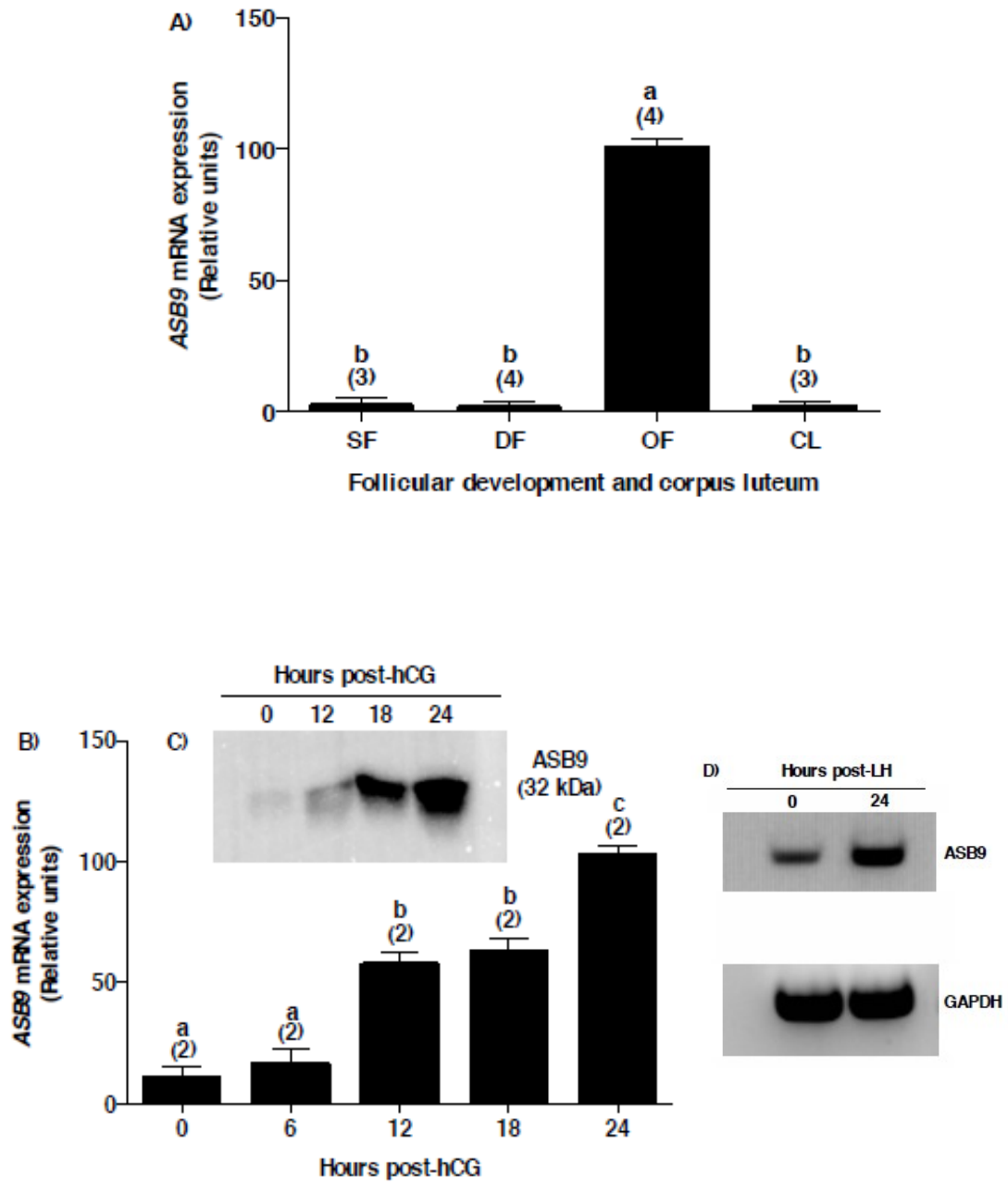


Figure 2

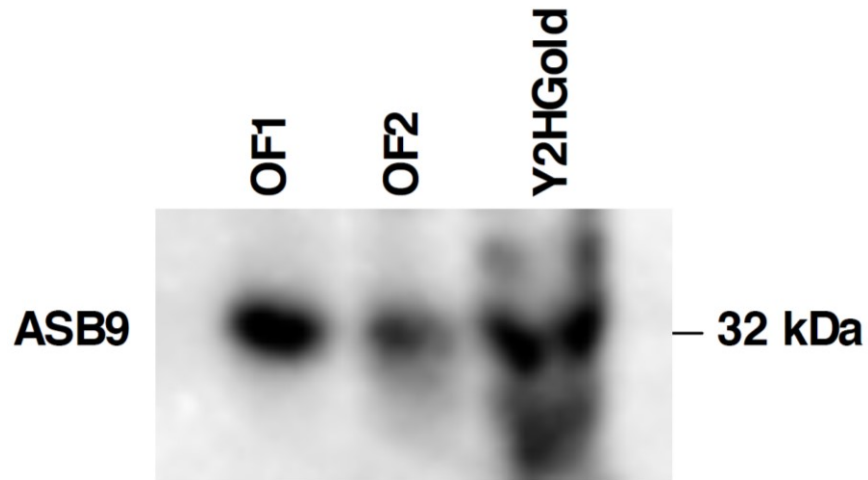


Figure 3

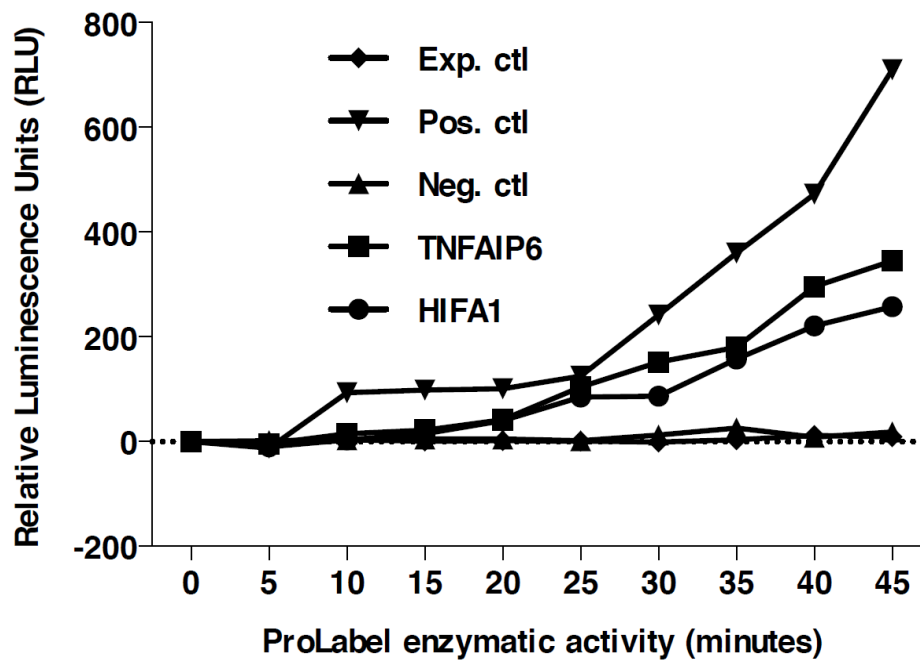


Figure 4

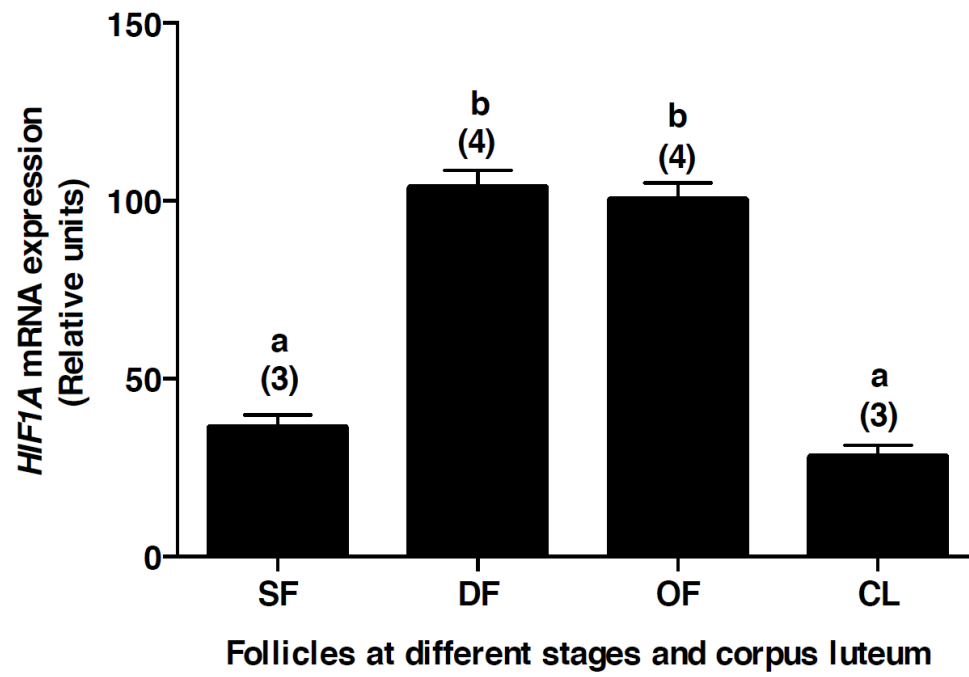


Figure 5

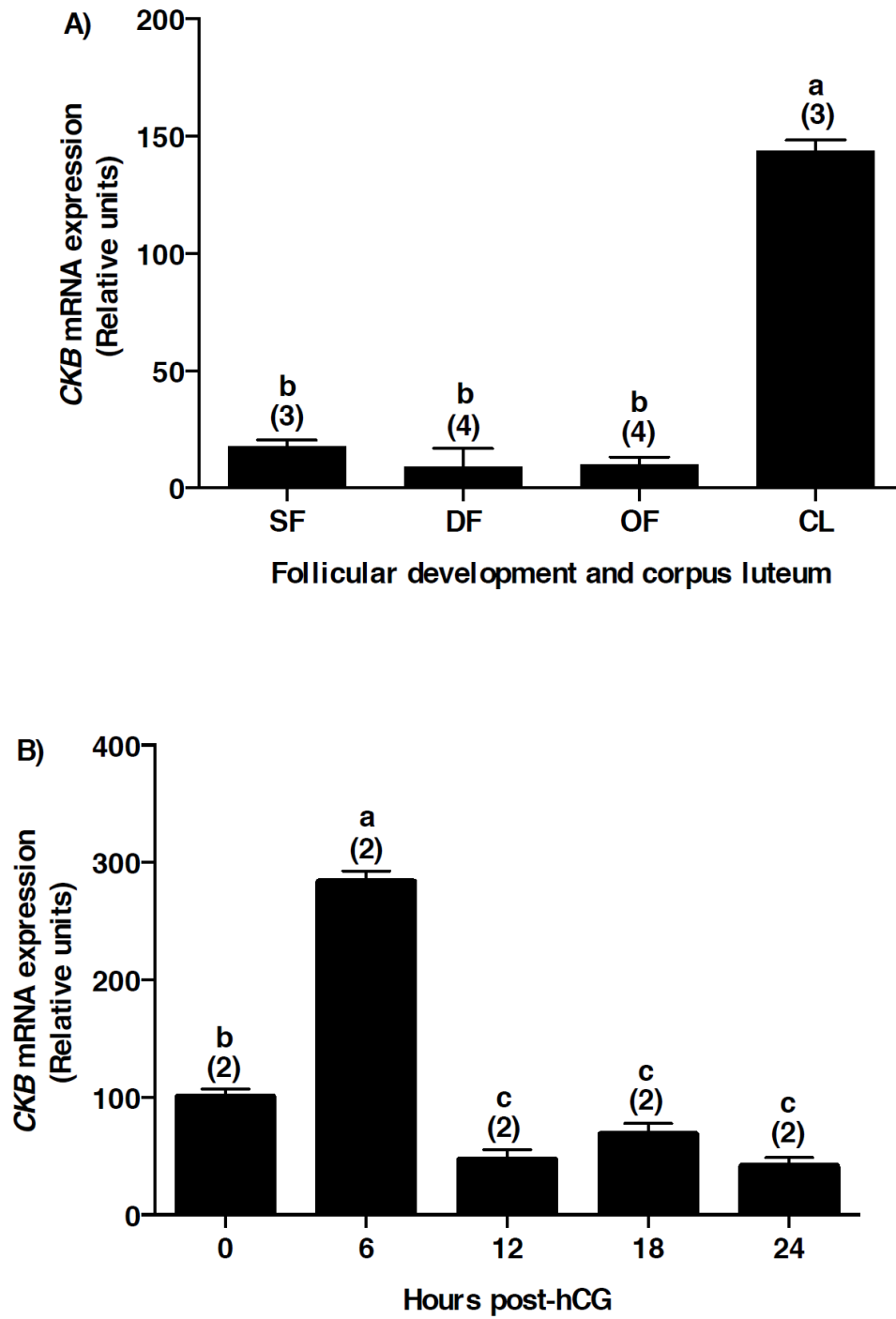


Figure 6

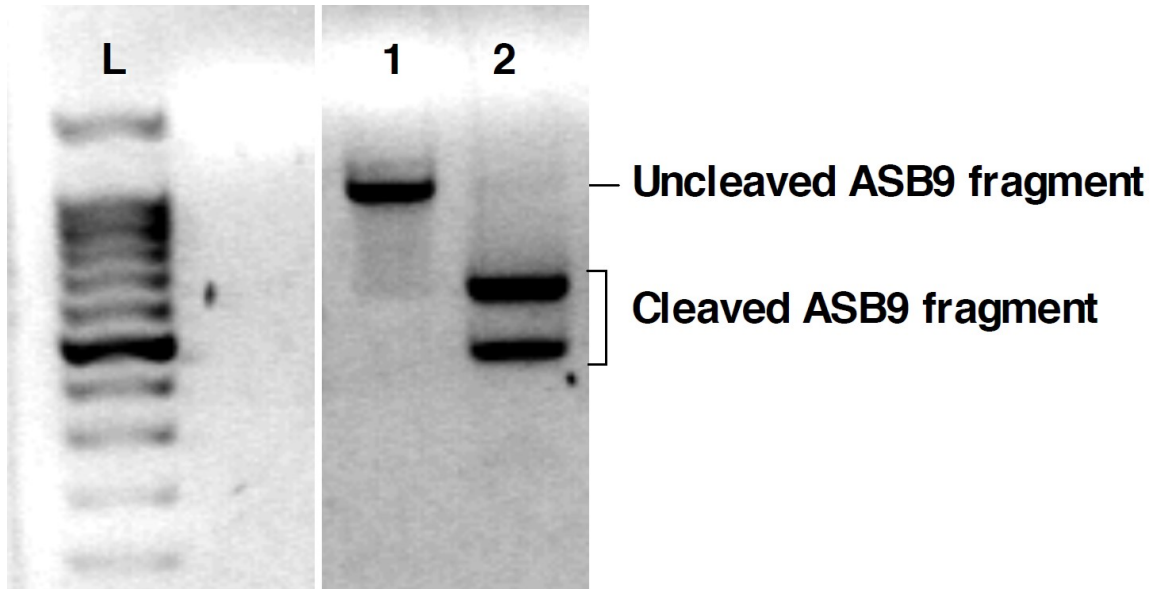


Figure 7

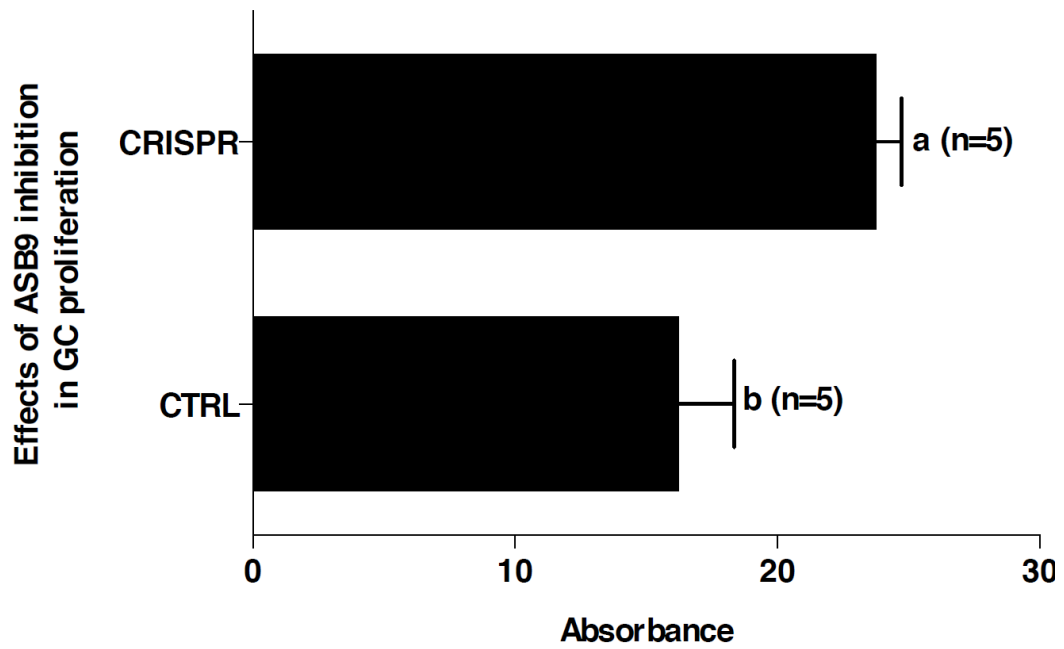
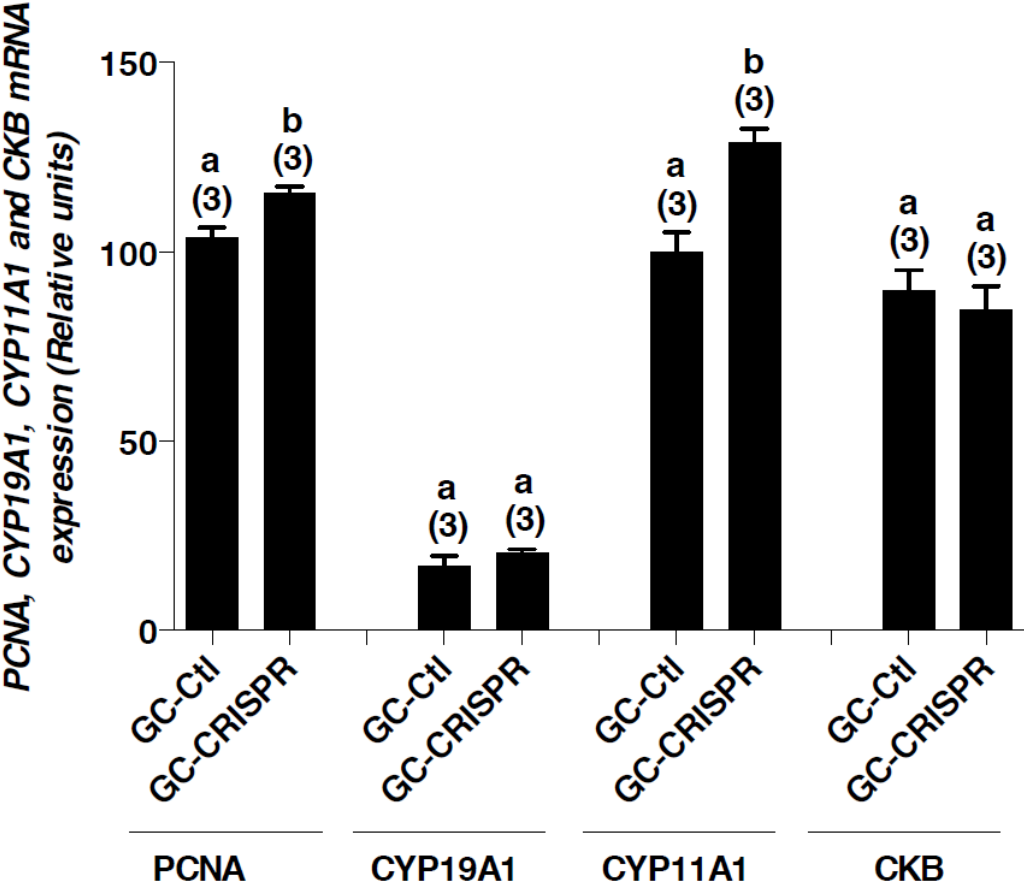


Figure 8



Effects of ASB9 inhibition in GC with CRISPR/Cas9

## Supporting information

### **S1 Figure. Toxicity and autoactivation analyses of the pGBKT7-ASB9 construct.**

Y2HGold yeast strain was transformed with the empty vector (pGBKT7-EV) as control and the construct containing ASB9 (pGBKT7-ASB9). Cells were spread on SD/-Trp, SD/-Trp/X (X = X-alpha-Gal) and SD/-Trp/X/A (A = Aureobasidin A antibiotic) media for toxicity and autoactivation analyses. The construct ASB9 was not toxic to Y2HGold strain nor to Y187 strain. Also, ASB9 did not, by itself, activate the transcription of reporter genes (AUR-C, ADE2, HIS3, and MEL1), which would have resulted in blue colonies in the presence of Aureobasidin A.

### **S2 Figure. Presence of zygotes as a result of Y2HGold[pGBKT7-ASB9] and Y187[pGADT7-Rec-OF cDNA] mating.**

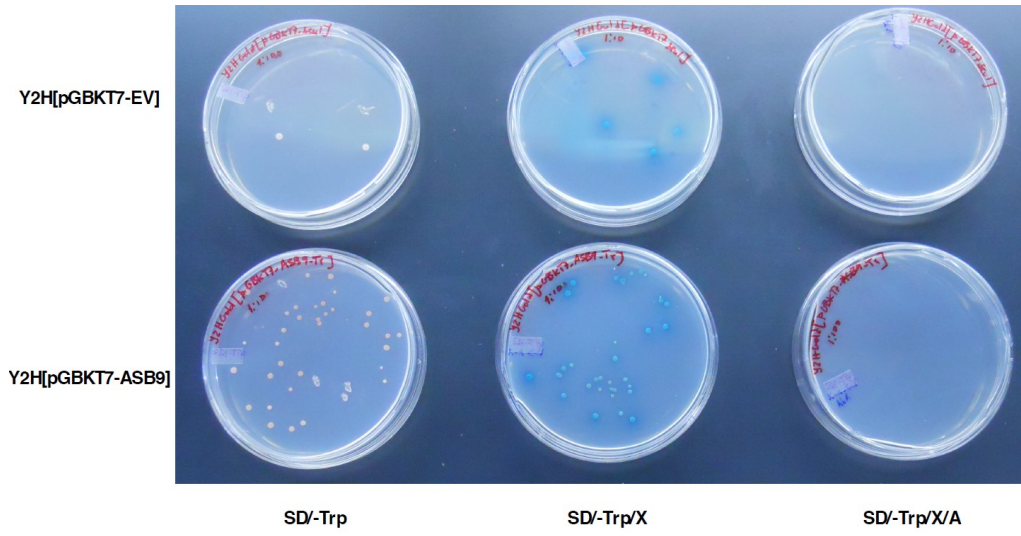
An overnight culture of Y2HGold[pGBKT7-ASB9] was mated with 1 ml of the Y187[pGADT7-cDNA] library. The presence of zygotes (arrows) indicates a potential interaction between the bait (ASB9) and a prey contained in the library. These zygotes grow as blue colonies on a double dropout medium (medium lacking Leucine and Tryptophan) supplemented with X-alpha-Gal and aureobasidin antibiotic (DDO/X/A).

### **S3 Figure. Representative result of blue colonies on DDO/X/A analyzed by yeast colony PCR.**

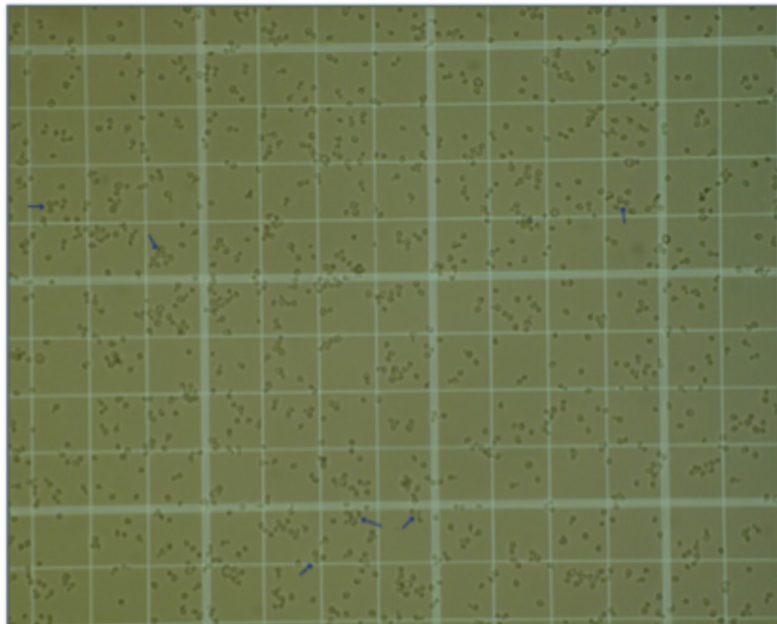
A slight portion of a blue colony from DDO/X/A was used to analyze for the presence or absence of an insert. The presence of an insert indicates a true positive suggesting a potential partner for ASB9 protein while the absence of an insert would have indicated a false positive. Blue colonies from DDO/X/A were further spread on the more stringent medium of quadruple dropout lacking Adenine, Histidine, Leucine, and Tryptophan and in the presence of the antibiotic aureobasidin (QDO/X/A). Plasmids were purified from true positive yeast colonies (grown on QDO/X/A), amplified by PCR and sequenced.



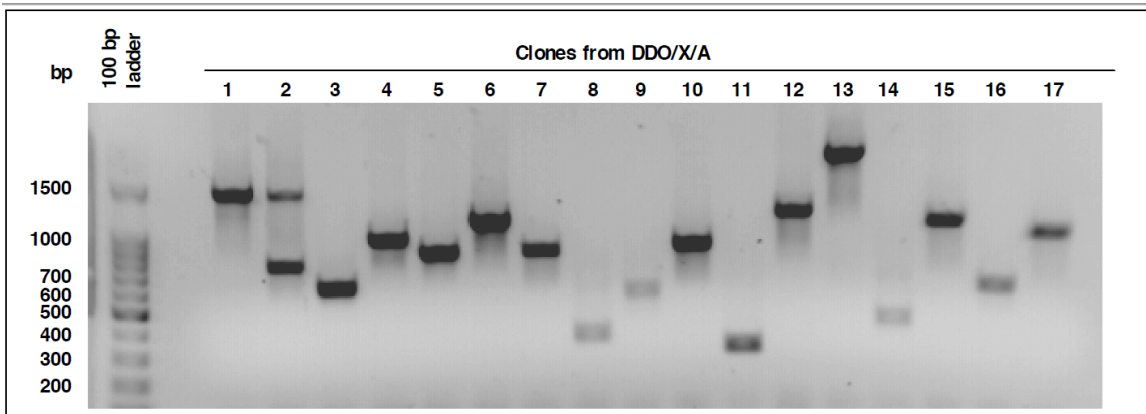
## S1 Figure



## S2 Figure



S3 Figure



# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

## **1 - Résumé et pertinence des résultats**

### **1.1-Analyse de l'expression de l'ARNm et de la protéine ASB9 dans les CG (SF, DF, OF), le CL et les dans les extraits de paroi folliculaires**

Les analyses par RT-qPCR et Western blot ont montré qu'ASB9 est exprimé de façon différentielle dans les CG du follicule ovulatoire à partir de 12 h post-hCG, avec une expression maximale à 24 h aussi bien de l'ARNm que de la protéine. Cette expression différentielle de l'ARNm à 24 h a été confirmée suite à la stimulation par un pic de LH endogène. **L'ensemble de ces résultats confirme qu'ASB9 est effectivement induit suite à une stimulation hormonale et de façon dépendante du temps et permettent par le fait même de répondre aux objectifs 1 et 2.** Étant donné que l'expression d'ASB9 dans le follicule ovulatoire est considérablement induite par rapport au follicule dominant en croissance, il a été suggéré qu'ASB9 puisse jouer un rôle dans le processus ovulatoire et/ou le remodelage de la matrice extracellulaire en ciblant des protéines spécifiques, possiblement pour les diriger vers la dégradation dans le protéasome. ASB9 pourrait ainsi contribuer à la différenciation des cellules de granulosa en cellules lutéales.

### **1.2- Identification des protéines interagissant avec ASB9 dans les CG du OF et comparaison de leur expression génique (ARNm) dans les CG (SF, DF, OF) et le CL**

La méthode du double hybride utilisée dans ce projet a rendu possible l'identification d'une dizaine de protéines partenaires d'ASB9 dans les CG de follicules ovulatoires bovins, incluant TNFAIP6, HIF1A et CYTB, permettant ainsi de répondre à l'objectif 3. ASB9 se lie à ces différentes protéines et pourrait vraisemblablement participer à leur dégradation dans les protéasomes via la voie de la polyubiquitination. Cette modulation génique, présente tardivement suite au pic de LH, pourrait participer aux dernières étapes de remodelage tissulaire menant à l'ovulation proprement dite, mais aussi au changement de phénotype des CG vers les cellules lutéales. **Dans un second temps, les analyses par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm de HIF1A et de CYTB dans les CG et le CL ont permis de répondre à l'objectif 4.**

### 1.2.1- TNFAIP6

*Tumor necrosis factor alpha-induced protein 6* (TNFAIP6), aussi appelé *Tumor necrosis factor-stimulated gene 6* (TSG6), est une protéine sécrétée, induite par plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont TNF $\alpha$  et l'interleukine-1 (Lee, Klampfer et al. 1993, Milner and Day 2003). De plus, elle contient un domaine liant l'acide hyaluronique (Salustri, Camaioni et al. 1999). Cette capacité de liaison lui confère un rôle de premier plan dans la stabilité de la matrice extracellulaire et de la migration cellulaire (Lee, Wisniewski et al. 1992, Lesley, Gal et al. 2004). La relâche préovulatoire de LH endogène ou l'injection d'hCG induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le processus ovulatoire, y compris TNFAIP6, qui est fortement induit dans les cellules folliculaires de rongeurs, des juments et de la vache (Fulop, Kamath et al. 1997, Yoshioka, Ochsner et al. 2000, Park, Su et al. 2004, Sayasith, Dore et al. 2007, Lussier, Diouf et al. 2017). TNFAIP6 a un rôle connu dans la formation d'un complexe avec l'inter- $\alpha$ -inhibiteur (I $\alpha$ I). Ce complexe renforce l'activité inhibitrice de la sérine protéase de I $\alpha$ I, cette dernière étant essentielle dans le réseau de protéases associé à l'inflammation (Wisniewski, Hua et al. 1996, Nagyeri, Radacs et al. 2011). Il est bien établi que le processus d'ovulation partage de nombreux signes d'une réaction inflammatoire aiguë (Espey 1980) et implique une série d'événements, décrits plus haut, tels que la formation de la matrice extracellulaire et l'expansion du complexe cumulus-ovocyte (COC), conduisant à la rupture du follicule pré-ovulatoire et à la libération de l'ovocyte (Mukhopadhyay, Hascall et al. 2001, Zhuo and Kimata 2001). Il est donc pertinent que TNFAIP6 soit fortement exprimé dans le follicule ovulatoire bovin pendant le processus d'ovulation ou suite à une stimulation avec l'hCG. Plusieurs études ont documenté le rôle crucial de TNFAIP6 dans la production de la matrice extracellulaire, l'expansion des cellules du cumulus et la fertilité (Wisniewski, Hua et al. 1996, Fulop, Kamath et al. 1997, Mukhopadhyay, Hascall et al. 2001). Une étude antérieure a également mis en évidence une induction marquée de TNFAIP6 par les gonadotrophines dans les cellules folliculaires avant la rupture du follicule chez la vache (Sayasith, Sirois et al. 2013).

Bien que TNFAIP6 puisse être ciblé par ASB9, probablement pour être dégradé par le protéasome, le mécanisme par lequel ASB9 se lie à TNFAIP6 reste à déterminer. Cependant, la liaison d'ASB9 à TNFAIP6 pourrait constituer un mécanisme de régulation facilitant la rupture du follicule et la transition vers la lutéinisation. En outre, le ciblage de TNFAIP6 par ASB9 se

produit probablement juste avant l'ovulation, après la libération de LH ou l'injection de hCG, lorsque l'expression d'ASB9 est la plus forte et que l'activité de TNFAIP6 n'est plus nécessaire à la stabilité de la matrice extracellulaire ou l'expansion du COC. En effet, il a été démontré dans les CG bovines que l'expression de TNFAIP6 augmentait de façon importante au bout de 6 h après la LH et diminuait de manière significative 22 h après la LH (Gilbert, Robert et al. 2011). Une autre étude, utilisant également des CG bovines, a rapporté une induction significative de l'expression de TNFAIP6 6 h après hCG, l'induction la plus forte ayant lieu 12 h après hCG (Sayasith, Bouchard et al. 2008). Ces deux études semblent indiquer une action cruciale de TNFAIP6 entre 6 et 12 h après LH/hCG, suggérant qu'à 24 h après LH/hCG, l'activité de TNFAIP6 pourrait être régulée par ASB9, possiblement via son ubiquitination et sa dégradation dans les protéasomes. Comme mentionné plus haut, l'induction de divers gènes par la LH/hCG au cours de la période périovulatoire varie considérablement chez plusieurs espèces (Ndiaye, Fayad et al. 2005, Sayasith, Bouchard et al. 2008, Li, Jimenez-Krassel et al. 2009, Gilbert, Robert et al. 2011, Christenson, Gunewardena et al. 2013, Sayasith, Sirois et al. 2013, Lussier, Diouf et al. 2017, Romereim, Summers et al. 2017). De plus, les pics d'expression d'ASB9 et de TNFAIP6 semblent se produire à différents moments après la relâche de LH ou l'injection d'hCG, ce qui suggère qu'ASB9 ne se lierait à TNFAIP6 qu'après la participation de cette dernière aux étapes critiques de l'ovulation.

### **1.2.2-HIF1A**

Une autre protéine partenaire d'ASB9 identifiée lors de notre analyse double hybride est le facteur de transcription *hypoxia-inducible factor-1 alpha subunit* (HIF1A). Cette protéine, induite lors d'hypoxie, forme un hétérodimère avec la sous-unité bêta. La protéine complète (*hypoxia-inducible factor-1*) a pour rôle principal l'adaptation du métabolisme cellulaire lors de privation en oxygène. Il est très intéressant de noter qu'en absence de restriction en oxygène, HIF1A est détruit dans les protéasomes via la voie de la polyubiquitination (Maxwell, Wiesener et al. 1999, Sutter, Laughner et al. 2000), voie dans laquelle ASB9 serait impliquée via sa boîte SOCS.

L'expression d'HIF1A dans les CG est maximale dans le follicule dominant et le follicule ovulatoire, alors qu'elle chute de façon importante dans le CL. Cette augmentation

d'expression d'HIF1A dans les CG de ces groupes de follicules concorde avec une prolifération cellulaire importante, donc un manque graduel d'oxygène, engendré par la stimulation des gonadotrophines (Alam, Weck et al. 2009). Il est possible qu'ASB9 cible HIFA pour sa dégradation suite à l'ovulation, au moment où les CG passent d'un état de prolifération à un état de différenciation vers les cellules lutéales. Il a été démontré que la vascularisation du follicule suite à une hypoxie de courte durée est initialement le résultat de l'activation HIF1A (Meidan, Klipper et al. 2013, Nishimura and Okuda 2015, Thompson, Brown et al. 2015). Suivant son activation, HIF1A stimule le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Fraser, Wilson et al. 2005), un facteur important de l'angiogenèse ainsi que le *Basic fibroblast growth factor 2* (FGF2) (Yamashita, Kamada et al. 2008, Laird, Woad et al. 2013) et l'endothéline 2 (Cacioppo, Lin et al. 2017) qui contribuent à l'angiogenèse du CL en formation.

### **1.2.3-CYTB**

Enfin, l'interaction entre ASB9 et le cytochrome B a aussi été identifiée dans les CG. Le cytochrome B (CYTB) est une composante du complexe ubiquinol-cytochrome c réductase et joue un rôle clé dans les mitochondries au sein d'un groupe de protéines nommé complexe III (Esposti, De Vries et al. 1993, Dasgupta, Hoque et al. 2008). Dans les mitochondries, le complexe III effectue une étape du processus de phosphorylation par oxydation dans lequel de l'oxygène et des sucres simples sont utilisés pour créer de l'adénosine triphosphate (ATP). Les altérations du CYTB affectent la formation du complexe III, réduisant considérablement l'activité de ce dernier et la phosphorylation oxydative (Esposti, De Vries et al. 1993, Dasgupta, Hoque et al. 2008). Dans les tissus reproducteurs, une augmentation des taux d'ARNm du *CYTB* mitochondrial ovarien est observée lors de la vitellogenèse précoce à tardive dans les ovaires d'anguilles ayant subi une maturation artificielle (Lokman, Kazeto et al. 2003). Il a été suggéré que cette augmentation d'expression reflète l'accumulation de la machinerie permettant une meilleure synthèse d'ATP nécessaire pendant l'oogenèse (Lokman, Kazeto et al. 2003). Dans le présent modèle, il n'y avait pas de variation significative de l'expression de CYTB au cours du développement folliculaire des petits follicules aux follicules ovulatoires et dans le CL suggérant un rôle de maintien du CYTB pendant le développement folliculaire et l'ovulation.

### 1.3 - Effet *in vitro* d'ASB9 sur la prolifération de CG bovine

L'inhibition de l'expression d'ASB9 dans les CG à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 a permis d'étudier les effets d'ASB9 sur la prolifération des CG bovines ainsi que sur l'expression de gènes cibles reliés à leur fonction rendant ainsi possible l'atteinte de l'objectif 5. Principalement, il a été démontré, *in vitro*, qu'ASB9 inhibe la prolifération des CG et affecterait l'expression de certains gènes stéroïdogeniques notamment CYP11A1. En effet, dans cette étude, l'inhibition de l'expression d'ASB9 dans les CG à l'aide de l'approche CRISPR/Cas9 a conduit à une prolifération accrue des CG et à la modulation de l'expression de gènes spécifiques dont le gène CYP11A1 codant pour l'enzyme P450<sub>scc</sub> (cytochrome P450 *side-chain cleavage*) impliquée dans la stéroïdogenèse. Dans les tissus stéroïdogeniques tels que l'ovaire ou le testicule, l'étape initiale et limitante de la voie menant du cholestérol aux hormones stéroïdiennes est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol générant la prégnénolone. Cette réaction est réalisée sous l'action de la CYP11A1 localisée dans la membrane interne mitochondriale (Morohashi, Fujii-Kuriyama et al. 1984, Chung, Matteson et al. 1986, John, Simpson et al. 1986). L'expression différentielle de *CYP11A1* lors de la dominance folliculaire pourrait jouer un rôle important dans la production d'androgènes menant à une plus grande synthèse d'œstradiol pour permettre le passage du follicule dominant au follicule ovulatoire. Dans le follicule ovulatoire, l'augmentation d'ASB9 réduirait l'expression de CYP11A1 ce qui aurait comme effet de réduire de façon transitoire la production de progestérone, tandis que la baisse d'ASB9 entraîne une augmentation de l'expression de *CYP11A1*. Dans le CL, *CYP11A1* est à nouveau fortement exprimé probablement en lien avec la production de progestérone dont la synthèse, lors de la stéroïdogenèse, nécessite *CYP11A1*. Ces observations indiquent qu'ASB9 pourrait être associé au contrôle de l'activité des gènes cibles impliqués dans le follicule ovulatoire immédiatement avant l'ovulation. Ces observations suggèrent également qu'ASB9 pourrait être impliqué dans la différenciation des CG en cellules lutéales, similaire à son rôle rapporté dans la spermatogenèse chez la souris (Lee, Kim et al. 2008).



## 2 – Implication des résultats

Au cours du développement folliculaire, les CG, comme celles de la thèque et l'ovocyte, subissent une série de changements à la suite de l'activation et de l'inhibition de gènes cibles (Fayad, Levesque et al. 2004, Ndiaye, Fayad et al. 2005, Skinner, Schmidt et al. 2008, Gilbert, Robert et al. 2011, Christenson, Gunewardena et al. 2013, Lussier, Diouf et al. 2017). Ces changements d'expression génique sont essentiels aux différents mécanismes qui guideront la prolifération et la différenciation cellulaires nécessaires à l'ovulation et la lutéinisation. Dans le follicule ovulatoire, une partie de ces changements est induite par le pic ovulatoire de la LH, cette dernière pouvant être mimée chez la vache par une injection d'hCG. Par conséquent, le follicule au stade péri-ovulatoire présente un ensemble de gènes induits par la relâche de LH ou l'injection d'hCG (Sayasith, Bouchard et al. 2008, Lussier, Diouf et al. 2017).

L'ovulation proprement dite permet la libération d'un ovocyte mature du follicule puis la transformation de ce follicule en CL. Les changements observés dans le follicule et l'ovocyte lors de l'ovulation sont donc initialement associés à l'augmentation rapide des concentrations de LH qui se lie à ses récepteurs membranaires présents sur les CG et de la thèque interne. La liaison de la LH à son récepteur entraîne une augmentation de la signalisation intracellulaire suivie de modifications de l'expression de gènes spécifiques et de l'activation de diverses voies de signalisation dans les cellules de la thèque, de la granulosa et du complexe cumulus-ovocyte (Espey and Lipner 1994, Richards and Ascoli 2018, Robker, Hennebold et al. 2018). Les divers signaux paracrines et autocrines induits par la LH contribuent aux événements menant à la rupture de la paroi folliculaire. Ces événements incluent un remodelage tissulaire, une réaction inflammatoire aiguë contrôlée ainsi que l'expansion des cellules du cumulus qui marquent la maturation finale du complexe des cellules du cumulus et de l'ovocyte.

Sous l'effet de la LH, le profil d'expression génique dans le follicule préovulatoire est modifié. Ainsi, l'expression de certains gènes est régulée à la baisse ou abolie tandis que d'autres gènes sont induits ou augmentés. Plusieurs études ont rapporté la variation de l'expression de gènes dans le follicule préovulatoire précédant la relâche de LH (Fayad, Levesque et al. 2004, Skinner, Schmidt et al. 2008, Hatzirodos, Glister et al. 2017) et suivant la relâche de LH (Ndiaye, Fayad et al. 2005, Li, Jimenez-Krassel et al. 2009, Gilbert, Robert et al. 2011, Christenson,

Gunewardena et al. 2013, Lussier, Diouf et al. 2017, Romereim, Summers et al. 2017). De plus, la relâche préovulatoire de LH induit les CG et de la thèque à se différencier, respectivement, en grandes et petites cellules lutéales qui contribuent en grande partie à la formation du CL. Ces cellules sont responsables de la synthèse des stéroïdes, principalement de la progestérone (Niswender, Juengel et al. 2000).

Le choix des follicules à analyser dans le cadre de cette étude physiologique a permis de dissocier les différentes étapes du développement folliculaire au cours de la période périovulatoire tout en ciblant les CG, un compartiment clé du follicule. Le modèle que nous avons préconisé chez la vache pour l'étude de la régulation de l'expression d'ASB9 n'induit pas d'artéfacts dans l'expression génique puisqu'il a été réalisé *in vivo*. De plus, ce modèle procure l'avantage d'isoler les composantes folliculaires de façon séparée et d'éviter l'utilisation d'homogénat total de l'ovaire tel qu'utilisé chez les rongeurs (Richards, Russell et al. 2002, Hennebold 2004). L'utilisation d'un modèle physiologique impliquant la relâche préovulatoire hypophysaire de la LH en fin de cycle œstral normal ou synchronisé aurait induit plus de variabilité entre le statut des follicules récupérés. Les critères morphologiques en réaction aux traitements et le suivi échographique des vaches ont permis de générer les groupes de follicules dominants et de follicules ovulatoires. Le dosage des hormones stéroïdiennes (œstradiol et progestérone) dans les liquides folliculaires a permis de confirmer les différences fonctionnelles entre ces groupes de follicules (Ndiaye, Fayad et al. 2005).

Avant la réalisation de l'étude comparant le profil d'expression génique de CG bovines de follicules ovulatoires suite à l'injection d'hCG à celui de CG issues de follicules dominants à jour 5 du cycle œstral (Lussier, Diouf et al. 2017), aucune étude antérieure n'a rapporté *ASB9* comme faisant partie des gènes induits par la LH/hCG lors de l'ovulation. À partir des observations de ces précédents travaux, nous avons émis l'hypothèse que l'expression d'ASB9 serait induite par la LH dans les CG et que, par sa fonction biologique, ASB9 contribuerait au contrôle de la fonction ovarienne. **Dans la présente étude, nous avons démontré, pour la première fois, l'induction d'ASB9 par la LH/hCG, avons rapporté les interactions d'ASB9 avec des protéines partenaires dans le système reproducteur utilisant les CG issues de follicules ovariens et avons dévoilé le rôle d'ASB9 dans le contrôle de la prolifération des cellules de granulosa, permettant ainsi de valider l'hypothèse de recherche.**

L'idée attribuant à ASB9 un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire est déjà présente dans la littérature, autant pour les protéines de la famille ASB phylogéniquement proches d'ASB9, soit ASB5, 11 et 13, que pour les substrats déjà validés d'ASB9 (Debrincat, Zhang et al. 2007, Kwon, Kim et al. 2010, Balasubramaniam, Schiffer et al. 2015, Schiffer, Malmstrom et al. 2016). Par exemple, une expression plus élevée d'ASB13 fut associée à la division cellulaire et contribue au développement du cancer (Chi, Murphy et al. 2018). De son côté, ASB5 serait impliqué dans le cheminement de différenciation finale des cellules précurseurs en cellules musculaires squelettiques et cardiaques ainsi que des cellules endothéliales et musculaires lisses lors de la formation des vaisseaux (Seale, Ishibashi et al. 2004, Zhang, Garcia-Gras et al. 2005). Finalement, ASB11, le plus proche parent d'ASB9, aurait comme fonction de maintenir les cellules progénitrices en mode prolifératif ou indifférencié dans le tissu neuronal (Diks, Bink et al. 2006) ou musculaire (Tee, Sartori da Silva et al. 2012) chez le poisson zèbre. L'arrêt de l'expression d'ASB11, provoqué par d'autres signaux extracellulaires, permettrait aux cellules de s'engager vers une différenciation finale (Diks, Bink et al. 2006, Tee, Sartori da Silva et al. 2012). Contrairement à ASB9, les autres membres de la famille, notamment ASB15 et ASB16, pourraient être impliqués dans la phase de croissance et de prolifération des CG étant donné qu'ils sont exprimés significativement plus fortement dans le follicule dominant comparé au follicule ovulatoire.

Les résultats de l'analyse de séquençage à haut débit (ARN-Seq) sont disponibles en annexe. Globalement, l'analyse ces résultats générés à partir d'ARN provenant d'échantillons de CG de follicules ovariens à différents stades (petits follicules, follicules dominants, follicules ovulatoires) et du CL a permis de comparer l'expression des différents gènes de la famille des ASB (ASB1 à 18) dans nos divers échantillons. En plus de confirmer les résultats de RT-qPCR quant à l'expression d'ASB9 et de ses partenaires (HIF1A et TNFAIP6) dans les CG des différents types de follicules, ces résultats ont démontré qu'ASB9 est le membre de la famille des ASB le plus fortement différenciellement exprimé dans les CG suite au traitement à la LH/hCG. Ces résultats obtenus par ARN-seq confirment ceux obtenus par analyse RT-qPCR et rapportés dans le présent mémoire (Benoit, Warma et al. 2019). Notons qu'aucune donnée sur l'expression du CYTB n'a été obtenue par ARN-Seq puisque ce gène est situé sur le chromosome mitochondrial et que les résultats de séquençage ont été alignés sur les séquences

génomiques bovines plutôt que mitochondriales. Bien qu'ASB5, ASB11 et ASB13 soient tous phylogéniquement très proches d'ASB9 (**Figure 8**), seul ASB11 montre une différence d'expression significative entre le groupe de follicules ovulatoires comparativement à celui de follicules dominants.

L'effet négatif d'ASB9 sur la prolifération cellulaire est reprise par deux autres études traitant du rôle d'ASB9 dans le cancer (Tokuoka, Miyoshi et al. 2010, Uranbileg, Enooku et al. 2014). Le premier papier traite du cancer colorectal et conclut que les patients exprimant des taux élevés d'ASB9 ont un taux de survie globale plus élevé que ceux exprimant de faibles taux et ce, possiblement via la réduction de la créatine kinase B (CKB), ce qui contribue à la diminution de la prolifération des cellules tumorales. De plus, il a été démontré que les cellules dans lesquelles l'expression d'ASB9 est invalidée (*Knock down*) montrent un taux d'envahissement cellulaire significativement supérieur (Tokuoka, Miyoshi et al. 2010). Une hypothèse semblable a aussi été démontrée avec la créatine kinase mitochondriale (CKMt) ubiquitaire et le carcinome hépatocellulaire (Uranbileg, Enooku et al. 2014). En effet, ASB9 réduit l'expression des protéines CKMt dans les cellules tumorales hépatiques ce qui conduit à l'augmentation de la mort cellulaire et réduit la prolifération, la migration et l'envahissement de ces cellules (Uranbileg, Enooku et al. 2014). Plus précisément, ASB9 interagit avec la CKMt et induit un dysfonctionnement des mitochondries, conduisant à une régulation négative de la prolifération cellulaire. En résumé, ces travaux sur le cancer colorectal et le carcinome hépatocellulaire chez l'espèce humaine ont démontré qu'une expression plus élevée d'ASB9 réduit la capacité proliférative des cellules; un constat en accord avec nos résultats.

Il est pertinent de rappeler que la CKB et la CKMt n'ont pas été identifiées comme partenaires d'ASB9 dans les CG bovines avec le système double-hybride dans la levure lors de notre analyse. Pour interagir et ainsi être identifiées par la méthode double-hybride, nous avons émis le raisonnement qu'ASB9 et les créatines kinases doivent être co-exprimées dans les CG de follicules ovulatoires. Or, nous avons démontré que l'expression de CKB suite à une stimulation d'hCG était réduite, contrairement à ASB9, lors des derniers stades de développement du follicule ovulatoire. L'expression de CKB était plutôt maximale dans le CL alors que l'expression d'ASB9 était significativement induite 24 h post-hCG et réduite dans le

CL, ce qui pourrait expliquer l'absence d'interaction entre ces deux protéines dans notre étude par l'application du système double-hybride.

### **3- Limitations et perspectives**

Tel que précédemment mentionné, le rôle principal de la boîte SOCS des protéines ASB est de servir de base à la formation d'un complexe enzymatique d'ubiquitination nommé E3. Suite à la formation du complexe E3, celui-ci permet de marquer une protéine spécifique afin de la diriger vers un processus final de dégradation et de recyclage. La boîte SOCS permet la liaison d'une ou de plusieurs unités d'ubiquitine à la protéine cible (protéine vieillissante, conformation inadéquate, processus de rétrocontrôle, etc.) afin de marquer cette dernière et permettre subséquemment de la diriger vers les protéasomes 26S pour sa dégradation.

Nous avons démontré dans les présents travaux qu'ASB9 interagit avec TNFAIP6, HIF1A et CYTB. L'action d'ASB9 sur ces protéines n'a cependant pu qu'être extrapolée à partir des connaissances déjà présentes dans la littérature sur les boîtes SOCS, les protéines de la famille ASB et les partenaires déjà connus d'ASB9, soit la créatinine kinase cytosolique de type B (CKB) et la créatinine kinase mitochondriale ubiquitaire (CKMt1). En effet, dans le cas de la CKB et la CKMt1, il a été démontré que la surexpression d'ASB9 occasionne une augmentation de l'ubiquitination suivie d'une dégradation aux protéasomes (Debrincat, Zhang et al. 2007, Kwon, Kim et al. 2010, Datler, Pazarentzos et al. 2014). Les interactions entre ASB9 et TNFAIP6, HIFA1 et CYTB pourraient mener à un processus similaire d'ubiquitination et de dégradation protéasomale de ces protéines. Cependant, cet aspect reste pour l'instant inconnu. En ce sens, plusieurs expérimentations additionnelles pourraient se greffer aux présents travaux notamment la vérification par analyse western de l'expression protéique des différentes partenaires d'ASB9 dans les CG et l'analyse du taux d'ubiquitination de ces partenaires suite à l'inhibition d'ASB9 par CRISPR-Cas9. En l'absence d'anticorps fiables dirigés contre les protéines partenaires d'ASB9 et l'ubiquitine, la spectrométrie de masse pourrait être utilisée.

Les protéines SOCS jouent aussi un rôle de régulateur négatif de la voie de signalisation JAK-STAT et peuvent remplir leurs fonctions principalement de trois façons (Piessevaux,

Lavens et al. 2008, Linossi and Nicholson 2012). Elles peuvent soit bloquer les sites de liaison des protéines STAT au récepteur transmembranaire, soit inhiber l'action des Janus kinase (JAK) ou finalement, elles peuvent participer à la dégradation des JAK et du récepteur transmembranaire en utilisant le principe d'ubiquitination qui permet d'orienter le complexe vers la voie de dégradation dans les protéasomes. En lien avec d'autres travaux déjà publiés (Ndiaye, Castonguay et al. 2016), il serait pertinent de déterminer si ASB9 avec sa boîte SOCS peut affecter négativement l'activité des membres de la famille JAK, en l'occurrence JAK3 dans les cellules de granulosa.

## **CONCLUSION**

Les connaissances sur l'architecture moléculaire et les interactions d'ASB9 en tant que complexe E3 ligase d'ubiquitine se précisent de plus en plus (Kohroki, Nishiyama et al. 2005, Linossi and Nicholson 2012, Muniz, Guo et al. 2013, Thomas, Matak-Vinkovic et al. 2013). Toutefois, la localisation, les partenaires et les rôles biologiques de cette protéine restent cependant encore peu connus. Comme précédemment mentionné, certains substrats d'ASB9 ont déjà été bien décrits et validés, notamment la créatine kinase cytosolique de type B (Debrincat, Zhang et al. 2007, Balasubramaniam, Schiffer et al. 2015, Schiffer, Malmstrom et al. 2016) et la créatine kinase mitochondriale ubiquitaire (Kwon, Kim et al. 2010). Finalement, grâce à l'étude de l'action d'ASB sur ses partenaires validés dans le contexte de différents cancers chez l'espèce humaine, nous savons qu'ASB9 joue un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Tokuoka, Miyoshi et al. 2010, Uranbileg, Enooku et al. 2014).

**Les travaux rapportés dans le présent mémoire font mention, pour la première fois, de la présence d'ASB9 et de ses partenaires potentielles (TNFAIP6, HIF1A et CYTB) dans l'ovaire, plus précisément dans les cellules de granulosa (CG), chez un mammifère. Il s'agit donc de la première caractérisation de la régulation d'ASB9 dans les CG pendant le développement folliculaire et dans le follicule ovulatoire suite à la stimulation par l'hCG ou la LH. De plus, ces données corroborent les résultats dans la littérature quant au rôle d'ASB9 dans le contrôle de la prolifération cellulaire. En effet, nos résultats ont démontré qu'ASB9 inhibe, in vitro, la prolifération des CG et pourrait donc affecter la fonction des CG en altérant l'action spécifique de différentes protéines.**

La connaissance des mécanismes responsables du processus d'ovulation et de lutéinisation sont à la base de la compréhension des problèmes de baisse de fertilité chez les animaux d'élevage, notamment chez la vache laitière. Ces problèmes ont un impact majeur sur la santé et la rentabilité des troupeaux. En connaissant mieux la régulation de l'expression génique présente à chacune des étapes du développement folliculaire et du processus d'ovulation et en comprenant le rôle de chacun des gènes impliqués, il deviendra possible d'identifier des marqueurs fiables de fertilité. Une plus grande connaissance de l'ovulation et de ses différentes étapes s'inscrit aussi dans une meilleure compréhension des processus tel que l'inflammation et le remodelage tissulaire.



# **BIBLIOGRAPHIE**

Alam, H., J. Weck, E. Maizels, Y. Park, E. J. Lee, M. Ashcroft and M. Hunzicker-Dunn (2009). "Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone." Endocrinology **150**(2): 915-928.

Andresen, C. A., S. Smedegaard, K. B. Sylvestersen, C. Svensson, D. Iglesias-Gato, G. Cazzamali, T. K. Nielsen, M. L. Nielsen and A. Flores-Morales (2014). "Protein interaction screening for the ankyrin repeats and suppressor of cytokine signaling (SOCS) box (ASB) family identify Asb11 as a novel endoplasmic reticulum resident ubiquitin ligase." J Biol Chem **289**(4): 2043-2054.

Babon, J. J., J. K. Sabo, A. Soetopo, S. Yao, M. F. Bailey, J. G. Zhang, N. A. Nicola and R. S. Norton (2008). "The SOCS box domain of SOCS3: structure and interaction with the elonginBC-cullin5 ubiquitin ligase." J Mol Biol **381**(4): 928-940.

Balasubramaniam, D., J. Schiffer, J. Parnell, S. P. Mir, R. E. Amaro and E. A. Komives (2015). "How the ankyrin and SOCS box protein, ASB9, binds to creatine kinase." Biochemistry **54**(8): 1673-1680.

Bedard, J., S. Brule, C. A. Price, D. W. Silversides and J. G. Lussier (2003). "Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle." Mol Reprod Dev **64**(2): 152-165.

Benoit, G., A. Warma, J. G. Lussier and K. Ndiaye (2019). "Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners." PLoS One **14**(2): e0212571.

Berisha, B. and D. Schams (2005). "Ovarian function in ruminants." Domest Anim Endocrinol **29**(2): 305-317.

Berisha, B., M. Steffl, H. Welter, H. Kliem, H. H. Meyer, D. Schams and W. Amselgruber (2008). "Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles." Reprod Fertil Dev **20**(2): 258-268.

Boengler, K., F. Pipp, B. Fernandez, A. Richter, W. Schaper and E. Deindl (2003). "The ankyrin repeat containing SOCS box protein 5: a novel protein associated with arteriogenesis." Biochem Biophys Res Commun **302**(1): 17-22.

Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel (2014). "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." Bioinformatics **30**(15): 2114-2120.

Bork, P. (1993). "Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally?" Proteins **17**(4): 363-374.

Bray, S. J. (2016). "Notch signalling in context." Nat Rev Mol Cell Biol **17**(11): 722-735.

Bray, S. J. and M. Gomez-Lamarca (2018). "Notch after cleavage." Curr Opin Cell Biol **51**: 103-109.

Cacioppo, J. A., P. P. Lin, P. R. Hannon, D. R. McDougale, A. Gal and C. Ko (2017). "Granulosa cell endothelin-2 expression is fundamental for ovulatory follicle rupture." Sci Rep **7**(1): 817.

Cahill, L. P. and P. Mauleon (1980). "Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep." J Reprod Fertil **58**(2): 321-328.

Cahill, L. P. and P. Mauleon (1981). "A study of the population of primordial and small follicles in the sheep." J Reprod Fertil **61**(1): 201-206.

Castrillon, D. H., L. Miao, R. Kollipara, J. W. Horner and R. A. DePinho (2003). "Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a." Science **301**(5630): 215-218.

Ch'ng, J. L. and B. Ibrahim (1994). "Transcriptional and posttranscriptional mechanisms modulate creatine kinase expression during differentiation of osteoblastic cells." J Biol Chem **269**(3): 2336-2341.

Chi, C., L. C. Murphy and P. Hu (2018). "Recurrent copy number alterations in young women with breast cancer." Oncotarget **9**(14): 11541-11558.

Choi, Y., K. Wilson, P. R. Hannon, K. L. Rosewell, M. Brannstrom, J. W. Akin, T. E. Curry, Jr. and M. Jo (2017). "Coordinated Regulation Among Progesterone, Prostaglandins, and EGF-Like Factors in Human Ovulatory Follicles." J Clin Endocrinol Metab **102**(6): 1971-1982.

Christenson, L. K., S. Gunewardena, X. Hong, M. Spitschak, A. Baufeld and J. Vanselow (2013). "Research resource: preovulatory LH surge effects on follicular theca and granulosa transcriptomes." Mol Endocrinol **27**(7): 1153-1171.

Chung, B. C., K. J. Matteson, R. Voutilainen, T. K. Mohandas and W. L. Miller (1986). "Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450<sub>scc</sub>: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8962-8966.

Dasgupta, S., M. O. Hoque, S. Upadhyay and D. Sidransky (2008). "Mitochondrial cytochrome B gene mutation promotes tumor growth in bladder cancer." Cancer Res **68**(3): 700-706.

Datler, C., E. Pazarentzos, A. L. Mahul-Mellier, W. Chaisaklert, M. S. Hwang, F. Osborne and S. Grimm (2014). "CKMT1 regulates the mitochondrial permeability transition pore in a process that provides evidence for alternative forms of the complex." J Cell Sci **127**(Pt 8): 1816-1828.

Debrincat, M. A., J. G. Zhang, T. A. Willson, J. Silke, L. M. Connolly, R. J. Simpson, W. S. Alexander, N. A. Nicola, B. T. Kile and D. J. Hilton (2007). "Ankyrin repeat and suppressors of cytokine signaling box protein asb-9 targets creatine kinase B for degradation." J Biol Chem **282**(7): 4728-4737.

Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." Annu Rev Biochem **78**: 399-434.

Dias, F. C. F., M. I. R. Khan, M. A. Sirard, G. P. Adams and J. Singh (2018). "Transcriptome analysis of granulosa cells after conventional vs long FSH-induced superstimulation in cattle." BMC Genomics **19**(1): 258.

Diks, S. H., R. J. Bink, S. van de Water, J. Joore, C. van Rooijen, F. J. Verbeek, J. den Hertog, M. P. Peppelenbosch and D. Zivkovic (2006). "The novel gene *asb11*: a regulator of the size of the neural progenitor compartment." J Cell Biol **174**(4): 581-592.

Diks, S. H., M. A. Sartori da Silva, J. L. Hillebrands, R. J. Bink, H. H. Versteeg, C. van Rooijen, A. Brouwers, A. B. Chitnis, M. P. Peppelenbosch and D. Zivkovic (2008). "d-Asb11 is an essential mediator of canonical Delta-Notch signalling." Nat Cell Biol **10**(10): 1190-1198.

Diouf, M. N., K. Sayasith, R. Lefebvre, D. W. Silversides, J. Sirois and J. G. Lussier (2006). "Expression of phospholipase A2 group IVA (PLA2G4A) is upregulated by human chorionic gonadotropin in bovine granulosa cells of ovulatory follicles." Biol Reprod **74**(6): 1096-1103.

Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson and T. R. Gingeras (2013). "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." Bioinformatics **29**(1): 15-21.

Douville, G. and M. A. Sirard (2014). "Changes in granulosa cells gene expression associated with growth, plateau and atretic phases in medium bovine follicles." J Ovarian Res **7**: 50.

Dow, M. P., L. J. Bakke, C. A. Cassar, M. W. Peters, J. R. Pursley and G. W. Smith (2002). "Gonadotrophin surge-induced upregulation of mRNA for plasminogen activator inhibitors 1 and 2 within bovine periovulatory follicular and luteal tissue." Reproduction **123**(5): 711-719.

Endo, T. A., M. Masuhara, M. Yokouchi, R. Suzuki, H. Sakamoto, K. Mitsui, A. Matsumoto, S. Tanimura, M. Ohtsubo, H. Misawa, T. Miyazaki, N. Leonor, T. Taniguchi, T. Fujita, Y. Kanakura, S. Komiya and A. Yoshimura (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." Nature **387**(6636): 921-924.

Eppig, J. J., K. Wigglesworth and F. L. Pendola (2002). "The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2890-2894.

Erickson, B. H. (1966). "Development and senescence of the postnatal bovine ovary." J Anim Sci **25**(3): 800-805.

Espey, L. L. (1980). "Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis." Biol Reprod **22**(1): 73-106.

Espey, L. L. and H. Lipner (1994). "Ovulation." Physiology of reproduction **vol /1**: 725-781.

Esposti, M. D., S. De Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Patarnello and A. Meyer (1993). "Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein." Biochim Biophys Acta **1143**(3): 243-271.

Evans, A. C. and J. E. Fortune (1997). "Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors." Endocrinology **138**(7): 2963-2971.

Evans, A. C., J. L. Ireland, M. E. Winn, P. Lonergan, G. W. Smith, P. M. Coussens and J. J. Ireland (2004). "Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle." Biol Reprod **70**(5): 1475-1484.

Fagerberg, L., B. M. Hallstrom, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpoor, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjostedt, E. Lundberg, C. A. Szgyarto, M. Skogs, J. O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J. M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten and M. Uhlen (2014). "Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics." Mol Cell Proteomics **13**(2): 397-406.

Fan, H. Y., Z. Liu, P. F. Johnson and J. S. Richards (2011). "CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)-alpha and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes." Mol Endocrinol **25**(2): 253-268.

Fan, H. Y., Z. Liu, M. Shimada, E. Sterneck, P. F. Johnson, S. M. Hedrick and J. S. Richards (2009). "MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility." Science **324**(5929): 938-941.

Favre, H., A. Benhamou, J. Finidori, P. A. Kelly and M. Edery (1999). "Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction." FEBS Lett **453**(1-2): 63-66.

Fayad, T., V. Levesque, J. Sirois, D. W. Silversides and J. G. Lussier (2004). "Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization." Biol Reprod **70**(2): 523-533.

Fei, X., X. Gu, S. Fan, Z. Yang, F. Li, C. Zhang, W. Gong, Y. Mao and C. Ji (2012). "Crystal structure of Human ASB9-2 and substrate-recognition of CKB." Protein J **31**(4): 275-284.

Fortune, J. E. (1994). "Ovarian follicular growth and development in mammals." Biol Reprod **50**(2): 225-232.

Fortune, J. E., R. A. Cushman, C. M. Wahl and S. Kito (2000). "The primordial to primary follicle transition." Mol Cell Endocrinol **163**(1-2): 53-60.

Fortune, J. E., G. M. Rivera, A. C. Evans and A. M. Turzillo (2001). "Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle." Biol Reprod **65**(3): 648-654.

Fortune, J. E., G. M. Rivera and M. Y. Yang (2004). "Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle." Anim Reprod Sci **82-83**: 109-126.

Fraser, H. M., H. Wilson, J. S. Rudge and S. J. Wiegand (2005). "Single injections of vascular endothelial growth factor trap block ovulation in the macaque and produce a prolonged, dose-related suppression of ovarian function." J Clin Endocrinol Metab **90**(2): 1114-1122.

Fulop, C., R. V. Kamath, Y. Li, J. M. Otto, A. Salustri, B. R. Olsen, T. T. Glant and V. C. Hascall (1997). "Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes." Gene **202**(1-2): 95-102.

Gebremedhn, S., D. Salilew-Wondim, I. Ahmad, S. Sahadevan, M. M. Hossain, M. Hoelker, F. Rings, C. Neuhoff, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander and D. Tesfaye (2015). "MicroRNA Expression Profile in Bovine Granulosa Cells of Preovulatory Dominant and

Subordinate Follicles during the Late Follicular Phase of the Estrous Cycle." PLoS One **10**(5): e0125912.

Gilbert, I., C. Robert, S. Dieleman, P. Blondin and M. A. Sirard (2011). "Transcriptional effect of the LH surge in bovine granulosa cells during the peri-ovulation period." Reproduction **141**(2): 193-205.

Ginther, O. J. (2016). "The theory of follicle selection in cattle." Domest Anim Endocrinol **57**: 85-99.

Ginther, O. J., M. A. Beg, D. R. Bergfelt, F. X. Donadeu and K. Kot (2001). "Follicle selection in monovular species." Biol Reprod **65**(3): 638-647.

Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, M. A. Beg and K. Kot (2001). "Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance." Biol Reprod **65**(2): 345-350.

Ginther, O. J., S. V. Danguubiyam and R. R. Domingues (2019). "Follicle blood flow and FSH concentration associated with variations in characteristics of follicle selection in heifers." Theriogenology **125**: 93-101.

Girard, A., I. Dufort, G. Douville and M. A. Sirard (2015). "Global gene expression in granulosa cells of growing, plateau and atretic dominant follicles in cattle." Reprod Biol Endocrinol **13**: 17.

Golemis, E. A., I. Serebriiskii, R. L. Finley, Jr., M. G. Kolonin, J. Gyuris and R. Brent (2011). "Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 17**: Unit 17.13.

Gong, J. G., B. K. Campbell, T. A. Bramley, C. G. Gutierrez, A. R. Peters and R. Webb (1996). "Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist." Biol Reprod **55**(1): 68-74.

Haan, S., P. Ferguson, U. Sommer, M. Hiremath, D. W. McVicar, P. C. Heinrich, J. A. Johnston and N. A. Cacalano (2003). "Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation." J Biol Chem **278**(34): 31972-31979.



Hansel, W. and E. M. Convey (1983). "Physiology of the estrous cycle." J Anim Sci **57 Suppl 2**: 404-424.

Hatzirodos, N., C. Glister, K. Hummitzsch, H. F. Irving-Rodgers, P. G. Knight and R. J. Rodgers (2017). "Transcriptomal profiling of bovine ovarian granulosa and theca interna cells in primary culture in comparison with their in vivo counterparts." PLoS One **12**(3): e0173391.

Hatzirodos, N., K. Hummitzsch, H. F. Irving-Rodgers and R. J. Rodgers (2014). "Transcriptome profiling of the theca interna in transition from small to large antral ovarian follicles." PLoS One **9**(5): e97489.

Hatzirodos, N., K. Hummitzsch, H. F. Irving-Rodgers and R. J. Rodgers (2015). "Transcriptome comparisons identify new cell markers for theca interna and granulosa cells from small and large antral ovarian follicles." PLoS One **10**(3): e0119800.

Hatzirodos, N., H. F. Irving-Rodgers, K. Hummitzsch, M. L. Harland, S. E. Morris and R. J. Rodgers (2014). "Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes." BMC Genomics **15**: 24.

Hatzirodos, N., H. F. Irving-Rodgers, K. Hummitzsch and R. J. Rodgers (2014). "Transcriptome profiling of the theca interna from bovine ovarian follicles during atresia." PLoS One **9**(6): e99706.

Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.

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

Hosaka, T., W. H. Biggs, 3rd, D. Tieu, A. D. Boyer, N. M. Varki, W. K. Cavenee and K. C. Arden (2004). "Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2975-2980.

Hsueh, A. J., H. Billig and A. Tsafiriri (1994). "Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process." Endocr Rev **15**(6): 707-724.

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

Ireland, J. J. and J. F. Roche (1983). "Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins." Endocrinology **112**(1): 150-156.

Jensen, J. H., L. N. Conley, J. Hedegaard, M. Nielsen, J. F. Young, N. Oksbjerg, H. Hornshøj, C. Bendixen and B. Thomsen (2012). "Gene expression profiling of porcine skeletal muscle in the early recovery phase following acute physical activity." Exp Physiol **97**(7): 833-848.

John, M. E., E. R. Simpson, M. R. Waterman and J. I. Mason (1986). "Regulation of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 gene expression in adrenal cells in monolayer culture." Mol Cell Endocrinol **45**(2-3): 197-204.

Kamura, T., K. Maenaka, S. Kotoshiba, M. Matsumoto, D. Kohda, R. C. Conaway, J. W. Conaway and K. I. Nakayama (2004). "VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases." Genes Dev **18**(24): 3055-3065.

Kamura, T., S. Sato, D. Haque, L. Liu, W. G. Kaelin, Jr., R. C. Conaway and J. W. Conaway (1998). "The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families." Genes Dev **12**(24): 3872-3881.

Khan, D. R., D. A. Landry, E. Fournier, C. Vigneault, P. Blondin and M. A. Sirard (2016). "Transcriptome meta-analysis of three follicular compartments and its correlation with ovarian follicle maturity and oocyte developmental competence in cows." Physiol Genomics **48**(8): 633-643.

Kile, B. T., B. A. Schulman, W. S. Alexander, N. A. Nicola, H. M. Martin and D. J. Hilton (2002). "The SOCS box: a tale of destruction and degradation." Trends Biochem Sci **27**(5): 235-241.

Klipper, E., A. Levit, Y. Mastich, B. Berisha, D. Schams and R. Meidan (2010). "Induction of endothelin-2 expression by luteinizing hormone and hypoxia: possible role in bovine corpus luteum formation." Endocrinology **151**(4): 1914-1922.

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

Kohroki, J., T. Nishiyama, T. Nakamura and Y. Masuho (2005). "ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes." FEBS Lett **579**(30): 6796-6802.

Kwon, S., D. Kim, J. W. Rhee, J. A. Park, D. W. Kim, D. S. Kim, Y. Lee and H. J. Kwon (2010). "ASB9 interacts with ubiquitous mitochondrial creatine kinase and inhibits mitochondrial function." BMC Biol **8**: 23.

Laird, M., K. J. Woad, M. G. Hunter, G. E. Mann and R. S. Robinson (2013). "Fibroblast growth factor 2 induces the precocious development of endothelial cell networks in bovine luteinising follicular cells." Reprod Fertil Dev **25**(2): 372-386.

Lee, M. R., S. K. Kim, J. S. Kim, S. Y. Rhim and K. S. Kim (2008). "Expression of murine Asb-9 during mouse spermatogenesis." Mol Cells **26**(6): 621-624.

Lee, T. H., L. Klampfer, T. B. Shows and J. Vilcek (1993). "Transcriptional regulation of TSG6, a tumor necrosis factor- and interleukin-1-inducible primary response gene coding for a secreted hyaluronan-binding protein." J Biol Chem **268**(9): 6154-6160.

Lee, T. H., H. G. Wisniewski and J. Vilcek (1992). "A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44." J Cell Biol **116**(2): 545-557.

Lesley, J., I. Gal, D. J. Mahoney, M. R. Cordell, M. S. Rugg, R. Hyman, A. J. Day and K. Mikecz (2004). "TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44." J Biol Chem **279**(24): 25745-25754.

Li, B. and C. N. Dewey (2011). "RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome." BMC Bioinformatics **12**: 323.

Li, P., J. Meng, W. Liu, G. W. Smith, J. Yao and L. Lyu (2016). "Transcriptome Analysis of Bovine Ovarian Follicles at Predeviation and Onset of Deviation Stages of a Follicular Wave." Int J Genomics **2016**: 3472748.

Li, Q., F. Jimenez-Krassel, J. J. Ireland and G. W. Smith (2009). "Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process." Reproduction **137**(2): 297-307.

Linossi, E. M., J. J. Babon, D. J. Hilton and S. E. Nicholson (2013). "Suppression of cytokine signaling: the SOCS perspective." Cytokine Growth Factor Rev **24**(3): 241-248.

Linossi, E. M. and S. E. Nicholson (2012). "The SOCS box-adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation." IUBMB Life **64**(4): 316-323.

Lokman, P. M., Y. Kazeto, S. Ijiri, G. Young, T. Miura, S. Adachi and K. Yamauchi (2003). "Ovarian mitochondrial cytochrome b mRNA levels increase with sexual maturity in freshwater eels (*Anguilla* spp.)." J Comp Physiol B **173**(1): 11-19.

Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." Genome Biol **15**(12): 550.

Lussier, J. G., M. N. Diouf, V. Levesque, J. Sirois and K. Ndiaye (2017). "Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG." Reprod Biol Endocrinol **15**(1): 88.

Lussier, J. G., P. Matton and J. J. Dufour (1987). "Growth rates of follicles in the ovary of the cow." J Reprod Fertil **81**(2): 301-307.

Lussier, J. G., P. Matton, L. A. Guilbault, F. Grasso, R. J. Mapletoft and T. D. Carruthers (1994). "Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers." J Reprod Fertil **102**(1): 95-105.

Manabe, N., Y. Goto, F. Matsuda-Minehata, N. Inoue, A. Maeda, K. Sakamaki and T. Miyano (2004). "Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia." J Reprod Dev **50**(5): 493-514.

Marion, G. B., H. T. Gier and J. B. Choudary (1968). "Micromorphology of the bovine ovarian follicular system." J Anim Sci **27**(2): 451-465.

Markstrom, E., E. Svensson, R. Shao, B. Svanberg and H. Billig (2002). "Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation." Reproduction **123**(1): 23-30.

Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher and P. J. Ratcliffe (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-275.

McFarland, K. C., R. Sprengel, H. S. Phillips, M. Kohler, N. Rosembliit, K. Nikolics, D. L. Segaloff and P. H. Seeburg (1989). "Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family." Science **245**(4917): 494-499.

Meidan, R., E. Klipper, Y. Zalman and R. Yalu (2013). "The role of hypoxia-induced genes in ovarian angiogenesis." Reprod Fertil Dev **25**(2): 343-350.

Mihm, M., M. A. Crowe, P. G. Knight and E. J. Austin (2002). "Follicle wave growth in cattle." Reprod Domest Anim **37**(4): 191-200.

Mihm, M. and A. C. Evans (2008). "Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women." Reprod Domest Anim **43 Suppl 2**: 48-56.

Milner, C. M. and A. J. Day (2003). "TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation." J Cell Sci **116**(Pt 10): 1863-1873.

Miyamoto, A., K. Shirasuna, T. Shimizu and M. Matsui (2013). "Impact of angiogenic and innate immune systems on the corpus luteum function during its formation and maintenance in ruminants." Reprod Biol **13**(4): 272-278.

Morohashi, K., Y. Fujii-Kuriyama, Y. Okada, K. Sogawa, T. Hirose, S. Inayama and T. Omura (1984). "Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(15): 4647-4651.

Mukhopadhyay, D., V. C. Hascall, A. J. Day, A. Salustri and C. Fulop (2001). "Two distinct populations of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 protein in the extracellular

matrix of expanded mouse cumulus cell-oocyte complexes." Arch Biochem Biophys **394**(2): 173-181.

Muniz, J. R., K. Guo, N. J. Kershaw, V. Ayinampudi, F. von Delft, J. J. Babon and A. N. Bullock (2013). "Molecular architecture of the ankyrin SOCS box family of Cul5-dependent E3 ubiquitin ligases." J Mol Biol **425**(17): 3166-3177.

Nagyeri, G., M. Radacs, S. Ghassemi-Nejad, B. Trynieszewska, K. Olasz, G. Hutás, Z. Gyorfy, V. C. Hascall, T. T. Glant and K. Mikecz (2011). "TSG-6 protein, a negative regulator of inflammatory arthritis, forms a ternary complex with murine mast cell tryptases and heparin." J Biol Chem **286**(26): 23559-23569.

Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira and T. Kishimoto (1997). "Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor." Nature **387**(6636): 924-929.

Ndiaye, K., P. D. Carriere, J. Sirois, D. W. Silversides and J. G. Lussier (2015). "Differential expression of lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) in granulosa cells of ovarian follicles and in other bovine tissues." J Ovarian Res **8**: 12.

Ndiaye, K., A. Castonguay, G. Benoit, D. W. Silversides and J. G. Lussier (2016). "Differential regulation of Janus kinase 3 (JAK3) in bovine preovulatory follicles and identification of JAK3 interacting proteins in granulosa cells." J Ovarian Res **9**(1): 71.

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

Nishimura, R. and K. Okuda (2015). "Multiple roles of hypoxia in ovarian function: roles of hypoxia-inducible factor-related and -unrelated signals during the luteal phase." Reprod Fertil Dev.

Niswender, G. D., J. L. Juengel, P. J. Silva, M. K. Rollyson and E. W. McIntush (2000). "Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum." Physiol Rev **80**(1): 1-29.

Park, J. Y., Y. Q. Su, M. Ariga, E. Law, S. L. Jin and M. Conti (2004). "EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle." Science **303**(5658): 682-684.

Piessevaux, J., D. Lavens, T. Montoye, J. Wauman, D. Catteeuw, J. Vandekerckhove, D. Belsham, F. Peelman and J. Tavernier (2006). "Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling." J Biol Chem **281**(44): 32953-32966.

Piessevaux, J., D. Lavens, F. Peelman and J. Tavernier (2008). "The many faces of the SOCS box." Cytokine Growth Factor Rev **19**(5-6): 371-381.

Porter, D. A., R. M. Harman, R. G. Cowan and S. M. Quirk (2001). "Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development." Reproduction **121**(4): 561-566.

Quirk, S. M., R. G. Cowan, R. M. Harman, C. L. Hu and D. A. Porter (2004). "Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival." J Anim Sci **82 E-Suppl**: E40-52.

Rajamahendran, R. and C. Taylor (1991). "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 **92**(2): 461-467.

Rawlings, N. C., A. C. Evans, A. Honaramooz and P. M. Bartlewski (2003). "Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats." Anim Reprod Sci **78**(3-4): 259-270.

Richani, D. and R. B. Gilchrist (2018). "The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence." Hum Reprod Update **24**(1): 1-14.

Richards, J. S. (2007). "Genetics of ovulation." Semin Reprod Med **25**(4): 235-242.

Richards, J. S. and M. Ascoli (2018). "Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation." Trends Endocrinol Metab **29**(5): 313-325.

Richards, J. S., D. L. Russell, S. Ochsner and L. L. Espey (2002). "Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response." Annu Rev Physiol **64**: 69-92.

Robker, R. L., J. D. Hennebold and D. L. Russell (2018). "Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time." Endocrinology **159**(9): 3209-3218.

Roche, J. F. (1996). "Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective." Rev Reprod **1**(1): 19-27.

Rodgers, R. J. and H. F. Irving-Rodgers (2010). "Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid." Biol Reprod **82**(6): 1021-1029.

Romereim, S. M., A. F. Summers, W. E. Pohlmeier, P. Zhang, X. Hou, H. A. Talbott, R. A. Cushman, J. R. Wood, J. S. Davis and A. S. Cupp (2017). "Gene expression profiling of bovine ovarian follicular and luteal cells provides insight into cellular identities and functions." Mol Cell Endocrinol **439**: 379-394.

Rosenfeld, C. S., J. S. Wagner, R. M. Roberts and D. B. Lubahn (2001). "Intraovarian actions of oestrogen." Reproduction **122**(2): 215-226.

Russell, D. L. and R. L. Robker (2007). "Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex." Hum Reprod Update **13**(3): 289-312.

Russell, D. L. and R. L. Robker (2019). Ovulation: The Coordination of Intrafollicular Networks to Ensure Oocyte Release. The Ovary, Elsevier: 217-234.

Salilew-Wondim, D., I. Ahmad, S. Gebremedhn, S. Sahadevan, M. D. Hossain, F. Rings, M. Hoelker, E. Tholen, C. Neuhoff, C. Looft, K. Schellander and D. Tesfaye (2014). "The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle." PLoS One **9**(9): e106795.

Salustri, A., A. Camaioni, M. Di Giacomo, C. Fulop and V. C. Hascall (1999). "Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles." Hum Reprod Update **5**(4): 293-301.

Sartori da Silva, M. A., J. M. Tee, J. Paridaen, A. Brouwers, V. Runtuwene, D. Zivkovic, S. H. Diks, D. Guardavaccaro and M. P. Peppelenbosch (2010). "Essential role for the d-Asb11 cul5 Box domain for proper notch signaling and neural cell fate decisions in vivo." PLoS One **5**(11): e14023.



Sayasith, K., N. Bouchard, M. Dore and J. Sirois (2008). "Regulation of bovine tumor necrosis factor-alpha-induced protein 6 in ovarian follicles during the ovulatory process and promoter activation in granulosa cells." Endocrinology **149**(12): 6213-6225.

Sayasith, K., M. Dore and J. Sirois (2007). "Molecular characterization of tumor necrosis alpha-induced protein 6 and its human chorionic gonadotropin-dependent induction in theca and mural granulosa cells of equine preovulatory follicles." Reproduction **133**(1): 135-145.

Sayasith, K., J. Sirois and J. G. Lussier (2013). "Expression, regulation, and promoter activation of vanin-2 (VNN2) in bovine follicles prior to ovulation." Biol Reprod **89**(4): 98.

Schiffer, J. M., R. D. Malmstrom, J. Parnell, C. Ramirez-Sarmiento, J. Reyes, R. E. Amaro and E. A. Komives (2016). "Model of the Ankyrin and SOCS Box Protein, ASB9, E3 Ligase Reveals a Mechanism for Dynamic Ubiquitin Transfer." Structure **24**(8): 1248-1256.

Seale, P., J. Ishibashi, C. Holterman and M. A. Rudnicki (2004). "Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient myogenic cell." Dev Biol **275**(2): 287-300.

Shimada, M., T. Umehara and Y. Hoshino (2016). "Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation process." Reprod Med Biol **15**(4): 201-216.

Sirois, J. (1994). "Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo." Endocrinology **135**(3): 841-848.

Sirois, J. and M. Dore (1997). "The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process." Endocrinology **138**(10): 4427-4434.

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

Sirois, J., K. Sayasith, K. A. Brown, A. E. Stock, N. Bouchard and M. Dore (2004). "Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account." Hum Reprod Update **10**(5): 373-385.

Sisco, B., L. J. Hagemann, A. N. Shelling and P. L. Pfeffer (2003). "Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles." Endocrinology **144**(9): 3904-3913.

Skinner, M. K., M. Schmidt, M. I. Savenkova, I. Sadler-Riggleman and E. E. Nilsson (2008). "Regulation of granulosa and theca cell transcriptomes during ovarian antral follicle development." Mol Reprod Dev **75**(9): 1457-1472.

Somjen, D., Y. Weisman, A. Harell, E. Berger and A. M. Kaye (1989). "Direct and sex-specific stimulation by sex steroids of creatine kinase activity and DNA synthesis in rat bone." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3361-3365.

Son, W. Y., M. Das, E. Shalom-Paz and H. Holzer (2011). "Mechanisms of follicle selection and development." Minerva Ginecol **63**(2): 89-102.

Spicer, L. J. and S. E. Echternkamp (1995). "The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals." Domest Anim Endocrinol **12**(3): 223-245.

Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola and D. J. Hilton (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." Nature **387**(6636): 917-921.

Sutter, C. H., E. Laughner and G. L. Semenza (2000). "Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4748-4753.

Tee, J. M. and M. P. Peppelenbosch (2010). "Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology." Crit Rev Biochem Mol Biol **45**(4): 318-330.

Tee, J. M., M. A. Sartori da Silva, A. M. Rygiel, V. Muncan, R. Bink, G. R. van den Brink, P. van Tijn, D. Zivkovic, L. L. Kodach, D. Guardavaccaro, S. H. Diks and M. P. Peppelenbosch (2012). "asb11 is a regulator of embryonic and adult regenerative myogenesis." Stem Cells Dev **21**(17): 3091-3103.

Thomas, F. H. and B. C. Vanderhyden (2006). "Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth." Reprod Biol Endocrinol **4**: 19.

Thomas, J. C., D. Matak-Vinkovic, I. Van Molle and A. Ciulli (2013). "Multimeric complexes among ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9), ElonginBC, and Cullin 5: insights into the structure and assembly of ECS-type Cullin-RING E3 ubiquitin ligases." Biochemistry **52**(31): 5236-5246.

Thompson, J. G., H. M. Brown, K. L. Kind and D. L. Russell (2015). "The Ovarian Antral Follicle: Living on the Edge of Hypoxia or Not?" Biol Reprod **92**(6): 153.

Tilly, J. L. (1996). "Apoptosis and ovarian function." Rev Reprod **1**(3): 162-172.

Tokuoka, M., N. Miyoshi, T. Hitora, K. Mimori, F. Tanaka, K. Shibata, H. Ishii, M. Sekimoto, Y. Doki and M. Mori (2010). "Clinical significance of ASB9 in human colorectal cancer." Int J Oncol **37**(5): 1105-1111.

Uranbileg, B., K. Enooku, Y. Soroida, R. Ohkawa, Y. Kudo, H. Nakagawa, R. Tateishi, H. Yoshida, S. Shinzawa, K. Moriya, N. Ohtomo, T. Nishikawa, Y. Inoue, T. Tomiya, S. Kojima, T. Matsuura, K. Koike, Y. Yatomi and H. Ikeda (2014). "High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential." Int J Cancer **134**(9): 2189-2198.

Vidal, M. and S. Fields (2014). "The yeast two-hybrid assay: still finding connections after 25 years." Nat Methods **11**(12): 1203-1206.

Wang, F., I. Samudio and S. Safe (2001). "Transcriptional activation of rat creatine kinase B by 17beta-estradiol in MCF-7 cells involves an estrogen responsive element and GC-rich sites." J Cell Biochem **84**(1): 156-172.

Wang, H., M. La Russa and L. S. Qi (2016). "CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond." Annu Rev Biochem **85**: 227-264.

Wigglesworth, K., K. B. Lee, M. J. O'Brien, J. Peng, M. M. Matzuk and J. J. Eppig (2013). "Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is

required for meiotic arrest of mammalian oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(39): E3723-3729.

Winterhager, E. and G. M. Kidder (2015). "Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health." Hum Reprod Update **21**(3): 340-352.

Wisniewski, H. G., J. C. Hua, D. M. Poppers, D. Naime, J. Vilcek and B. N. Cronstein (1996). "TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo." J Immunol **156**(4): 1609-1615.

Woad, K. J. and R. S. Robinson (2016). "Luteal angiogenesis and its control." Theriogenology **86**(1): 221-228.

Yamashita, H., D. Kamada, K. Shirasuna, M. Matsui, T. Shimizu, K. Kida, B. Berisha, D. Schams and A. Miyamoto (2008). "Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow." Mol Reprod Dev **75**(9): 1449-1456.

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

Zhang, J., Y. Xu, H. Liu and Z. Pan (2019). "MicroRNAs in ovarian follicular atresia and granulosa cell apoptosis." Reprod Biol Endocrinol **17**(1): 9.

Zhang, S. X., E. Garcia-Gras, D. R. Wycuff, S. J. Marriot, N. Kadeer, W. Yu, E. N. Olson, D. J. Garry, M. S. Parmacek and R. J. Schwartz (2005). "Identification of direct serum-response factor gene targets during Me2SO-induced P19 cardiac cell differentiation." J Biol Chem **280**(19): 19115-19126.

Zhong, L., K. Ge, J. C. Zu, L. H. Zhao, W. K. Shen, J. F. Wang, X. G. Zhang, X. Gao, W. Hu, Y. Yen and K. H. Kernstine (2008). "Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer." Breast Cancer Res **10**(3): R40.

Zhuo, L. and K. Kimata (2001). "Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation." Cell Struct Funct **26**(4): 189-196.

Zielak-Steciwko, A. E., J. A. Browne, P. A. McGettigan, M. Gajewska, M. Dzieciol, T. Szulc and A. C. Evans (2014). "Expression of microRNAs and their target genes and pathways associated with ovarian follicle development in cattle." Physiol Genomics **46**(19): 735-745.

Zielak-Steciwko, A. E. and A. C. Evans (2016). "Genomic portrait of ovarian follicle growth regulation in cattle." Reprod Biol **16**(3): 197-202.

Zimin, A. V., A. L. Delcher, L. Florea, D. R. Kelley, M. C. Schatz, D. Puiu, F. Hanrahan, G. Pertea, C. P. Van Tassell, T. S. Sonstegard, G. Marcais, M. Roberts, P. Subramanian, J. A. Yorke and S. L. Salzberg (2009). "A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*." Genome Biol **10**(4): R42.

# **ANNEXE**

## **Comparaisons de l'expression des gènes de la famille des ASB, 1 à 18, dans les divers groupes de follicules et de corps jaune.**

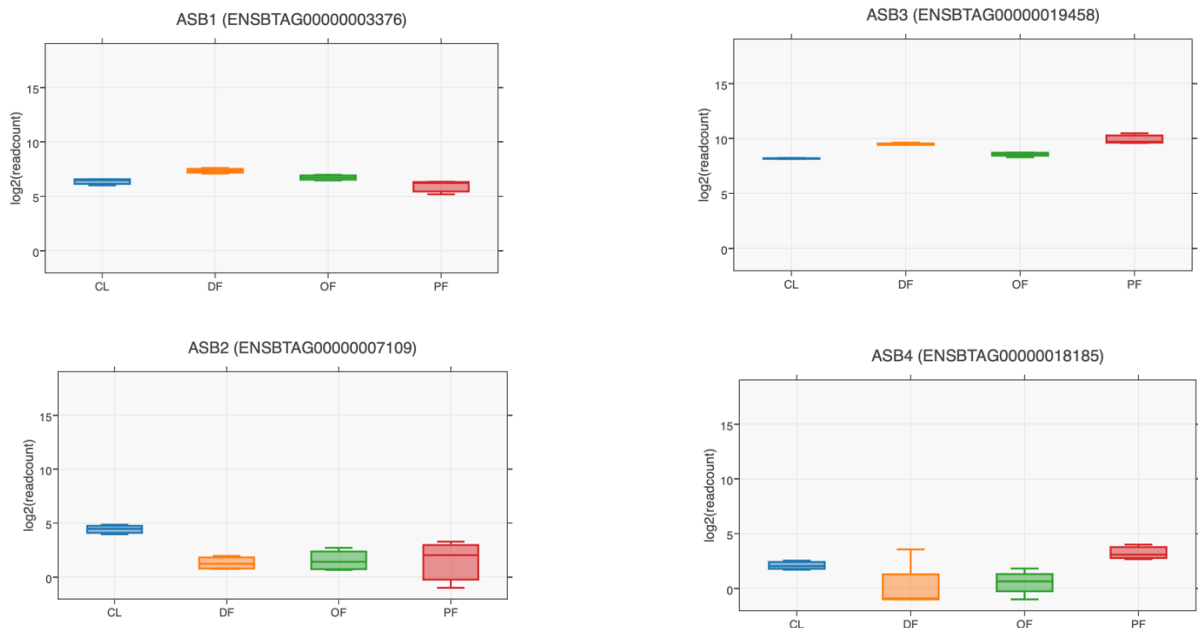
Une analyse par séquençage de nouvelle génération de type ARN-seq a été réalisée en parallèle à partir des mêmes échantillons d'ARN totaux que ceux utilisés dans le cadre de ce mémoire. Ces échantillons provenaient de CG prélevées de follicules à différents stades de développement, soit : de petits follicules de 2-4 mm (n= 3), de follicules dominants en croissance à J5 du cycle oestral (n= 4; J0 étant le jour de l'ovulation), de follicules ovulatoires induits à l'hCG (n=4) et de corps jaune à J5 (n= 3).

Les ARN totaux ont été isolés tel que décrit antérieurement (Bedard, Brule et al. 2003) puis traités à la DNase 1 et purifiés sur colonne par RNeasy MinElute Cleanup (Quiagen) selon le protocole établi par la trousse. La qualité des ARN totaux a été vérifiée par BioAnalyser Agilent 2100 sur Nanochip 6000. Les valeurs de RIN (RNA Integrity Number) variaient entre 7,5 et 10 avec une moyenne de 9,3 pour les 14 échantillons. Les ARN ribosomiaux ont été réduits ou éliminés par l'utilisation du kit Kapa RNA hyperprep riboerase (KapaBiosystems) pour plateforme de séquençage Illumina. Les cDNAs ont été fragmentés et amplifiés afin de générer les 14 bibliothèques d'ADNc correspondant aux divers échantillons SF (n = 3), DF (n = 4), OF (n=4) et CL (n=3). Le séquençage des divers fragments d'ADNc a été effectué sur 80 nucléotides à chaque extrémité des ADNc (« paired-end ») à l'aide d'un appareil Illumina NextSeq500 et d'une plaque à débit élevé de 400 millions de fragments. Les séquences d'adaptateurs pour le séquençage sur plate-forme Illumina ont été éliminées ainsi que les séquences de faibles qualité par le logiciel Trimmomatic v.0.35 (Bolger, Lohse et al. 2014). La qualité des séquences obtenues par échantillon variait de 84,0% à 88,7%, pour une moyenne de 87,9 %. L'alignement des séquences a été effectué par le logiciel STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference; v. 2.6.1d) en référence au génome *Bos taurus* version ARS-UCD1.2 (version 95) (Dobin, Davis et al. 2013). L'analyse du taux d'expression des gènes a été obtenue directement par le décompte des « reads » à partir de l'analyse du logiciel STAR et suite à l'utilisation du logiciel « RSEM » (RNA-Seq by Expectation Maximization) (Li and Dewey 2011). La

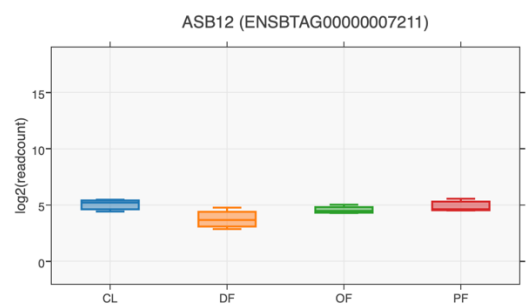
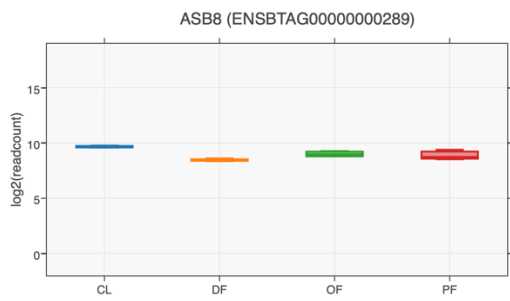
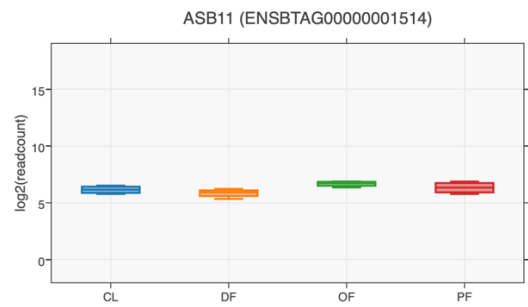
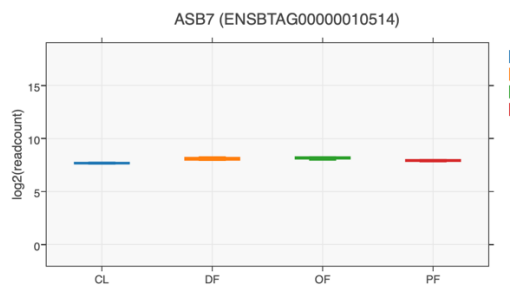
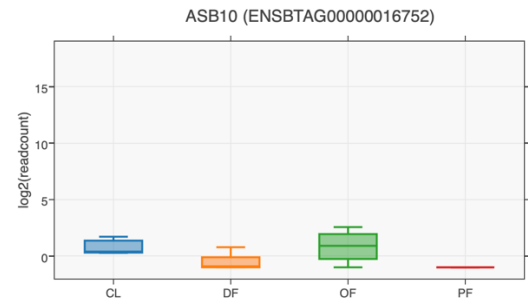
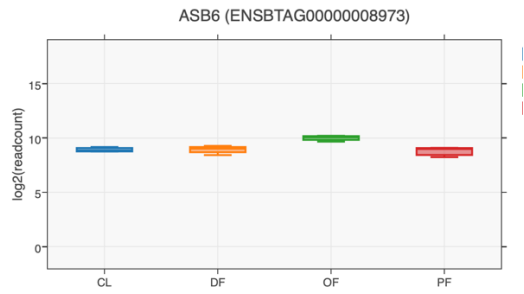
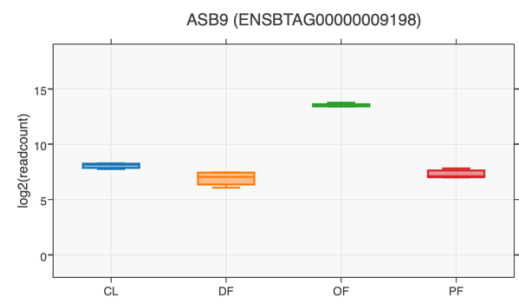
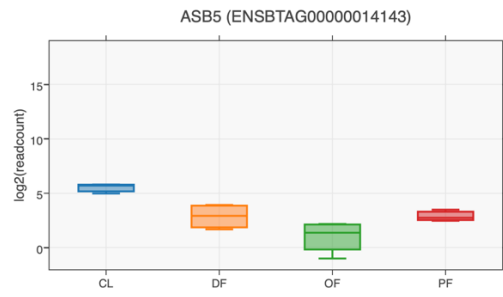
normalisation du décompte des « reads » correspondant à chaque gène a été effectuée par le logiciel DESeq2 (Differential Expression analysis for Sequence count data; v.1.22.1) (Love, Huber et al. 2014).

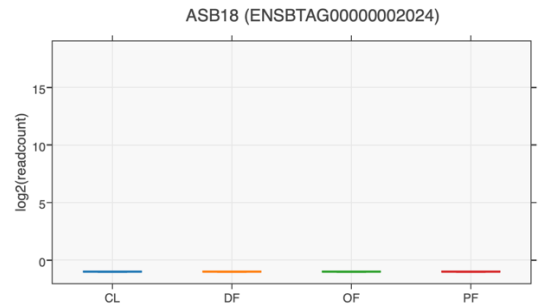
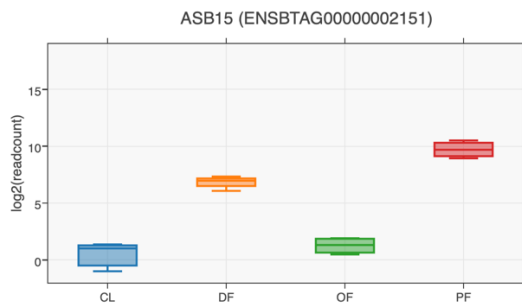
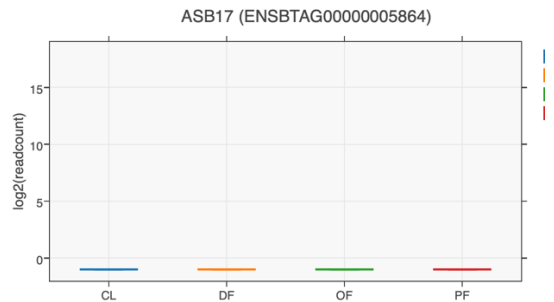
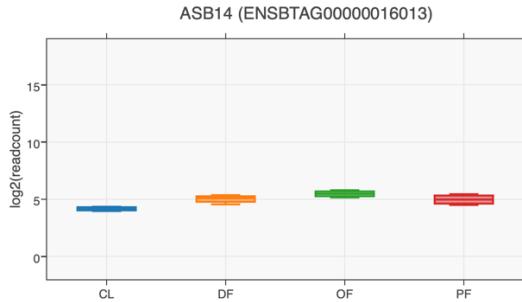
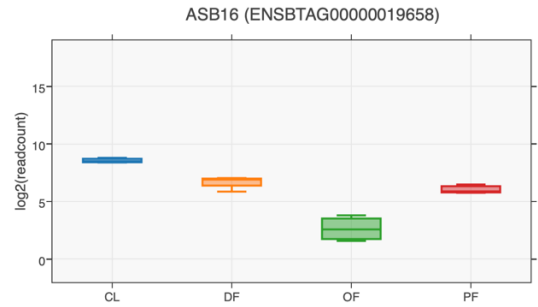
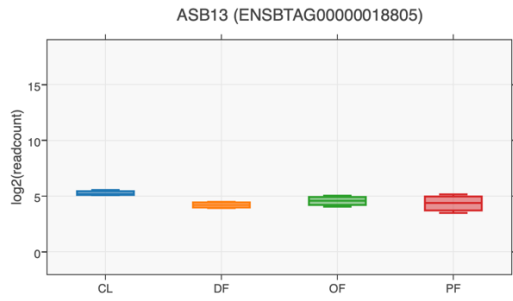
La comparaison du taux d'expression des gènes ASB 1 à 18 dans les échantillons SF, DF, OF et CL est présentée à la Figure 14. La comparaison de l'expression des différents gènes ASB entre les groupes OF comparés aux groupes DF ainsi que les valeurs de probabilité statistique sont présentées dans le Tableau III. L'analyse des résultats de l'expression des gènes par ARN-Seq démontre que de la famille des gènes ASB 1 à 18, ASB9 est le gène le plus fortement différentiellement exprimé dans les CG de follicules suite au traitement à la LH/hCG. Ces résultats confirment ceux obtenus par analyse RT-qPCR (Benoit, Warma et al. 2019). De plus, les résultats permettent d'apprécier qu'ASB15 et 16 sont les gènes qui présentent un taux d'expression différentiel le plus élevé dans les CG des follicules dominants (DF) comparativement au groupe traité à la LH/hCG (OF).

**Figure 14.** Comparaison par ARN-Seq de l'expression différentielle des différents membres de la famille des ASB









*Comparaison par ARN-Seq de l'expression différentielle en ARNm des différents membres de la famille des ASB 1 à 18 dans les cellules de granulosa de petits follicules (PF; 2 - 4 mm), de follicules dominants (DF), de follicules ovulatoires 24 h suivant l'injection d'hCG (OF) et de corps jaune (CL) à J5 du cycle œstral.*

**Tableau III.** Analyse par ARN-Seq de l'expression différentielle en ARNm des différents membres de la famille des ASB 1 à 18 lorsque l'expression des ASB du groupe OF (n = 4) est comparée au groupe DF (n = 4).

<i>Identification du gène</i>	<i>Différence du taux d'expression entre OF et DF (log2Fold change)<sup>1</sup></i>	<i>Déviati on standard de la différence du taux d'expression (LfcSE)<sup>2</sup></i>	<i>Valeur de probabilité corrigée (Padj)<sup>3</sup></i>
ASB-1*	-0,63	± 0,257	0,036
ASB-2	0,51	± 0,981	0,722
ASB-3*	-0,91	± 0,198	2,205e <sup>-5</sup>
ASB-4	-1,16	± 1,320	0,521
ASB-5*	-2,03	± 0,780	0,023
ASB-6*	1,05	± 0,232	2,94e <sup>-5</sup>
ASB-7	0,08	± 0,130	0,652
ASB-8*	0,56	± 0,199	0,013
ASB-9*	6,53	± 0,278	4,150e <sup>-119</sup>
ASB-10	2,48	± 1,960	0,205
ASB-11*	0,81	± 0,293	0,016
ASB-12	0,70	± 0,475	0,244
ASB-13	0,40	± 0,417	0,483
ASB-14	0,45	± 0,316	0,262
ASB-15*	-5,83	± 0,632	3,610e <sup>-19</sup>
ASB-16*	-3,87	± 0,415	1,618e <sup>-19</sup>
ASB-17	Pas exprimé	n.d.	n.d.
ASB-18	Pas exprimé	n.d.	n.d.

\* : indique une différence d'expression significative entre OF et DF à une valeur de P < 0,05.

<sup>1</sup>**Log2Foldchange** : représente le ratio entre les valeurs moyennes de OF et DF transformé en logarithme de base 2. Un log2Foldchange de 1 signifie que le gène est deux fois plus exprimé. À noter que l'analyse DESeq2 applique une correction aux gènes faiblement exprimés d'où une valeur légèrement différente qui simplifie le calcul du ratio. Une différence positive indique une expression plus élevée dans le groupe OF à comparer au groupe DF tandis qu'une différence négative indique une expression plus élevée dans le groupe DF à comparer au groupe OF.

<sup>2</sup>**LfcSE** : signifie « log2Foldchange standard error », il s'agit de l'estimation de la déviation standard du log2Foldchange.

<sup>3</sup>**Padj** : valeur de probabilité corrigée pour tenir compte du nombre élevé de mesures dans le cadre d'une expérience de ARN-Seq.