

Université de Montréal

**PHOSPHATASES À DOUBLE SPÉCIFICITÉ DANS
L'OVAIRE : RÔLE ET RÉGULATION PAR LES FACTEURS
DE CROISSANCE CHEZ LA VACHE ET LA BREBIS**

Par

LAURIANE RELAV

Département de biomédecine

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires, option reproduction

Août 2021

© Lauriane RELAV, 2021

Université de Montréal

Unité académique : Département de biomédecine, Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**PHOSPHATASES À DOUBLE SPÉCIFICITÉ DANS
L'OVAIRE : RÔLE ET RÉGULATION PAR LES FACTEURS
DE CROISSANCE CHEZ LA VACHE ET LA BREBIS**

Présentée par

LAURIANE RELAV

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

M. Alexandre Boyer
Président-rapporteur

M. Christopher Price
Directeur de recherche

M. Francis Beaudry
Codirecteur

M. Kalidou Ndiaye
Membre du jury

Mme Karine Reynaud
Examinatrice externe

Résumé

Les performances reproductrices des espèces d'intérêt agronomique sont dépendantes d'une régulation minutieuse de la folliculogénèse ovarienne. Parmi les régulateurs impliqués, il y a les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs), stimulant notamment la phosphorylation des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPKs), afin de contrôler le devenir du follicule mais aussi les événements qui y sont associés tels que la stéroïdogénèse, l'angiogénèse, la formation du corps jaune. Dans plusieurs types cellulaires non ovariens, des phosphatases à double spécificité (DUSPs), dont l'expression est induite en réponse à des facteurs de croissance, déphosphorylent les MAPKs. La présence et la régulation des DUSPs dans l'ovaire des mammifères est cependant peu documentée. Ces travaux de thèse avaient ainsi pour objectifs, (1) de déterminer la présence des DUSPs, (2) leur régulation par les FGFs et (3) leur rôle dans les cellules de granulosa de vache et de brebis. Dans la première étude effectuée chez la brebis, les ARNm codant pour 16 DUSPs ont été détectés, et leur profil d'expression a été dressé dans des cellules de granulosa issues de follicules antraux. Puis, les niveaux d'ARNm pour *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP5* et *DUSP6*, ainsi que les niveaux de protéines pour *DUSP1* et *DUSP6* ont été augmentés par FGF2 mais pas par FGF8 ou FGF18. L'inhibition de *DUSP1/6* et *DUSP1* a également suggéré un rôle pour *DUSP6* dans la déphosphorylation de MAPK8 chez la brebis. Avec la deuxième étude chez la vache, il ressort que la régulation de ces trois DUSPs semble bien conservée car les niveaux d'ARNm pour *DUSP1*, *DUSP5* et *DUSP6* et de protéines pour *DUSP5* et *DUSP6* ont été augmentés en réponse à FGF2. De plus, en s'intéressant au contrôle de l'expression de

DUSP1, DUSP5 et DUSP6, il est ressorti que l'accumulation d'ARNm pour *DUSP5* et *DUSP6* nécessitait l'activation de MAPK3/1, et la signalisation calcique pour les ARNm pour *DUSP6*. D'après l'ensemble de ces données, DUSP1, DUSP5 et DUSP6 sont régulées de manière complexe dans les cellules de granulosa, et peuvent être désignées comme des phosphatases participant à la signalisation des FGFs ; cela contribue ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs de la folliculogenèse chez les ruminants.

Mots-clés : phosphatases à double spécificité, facteurs de croissance, protéines kinases activées par des agents mitogènes, signalisation calcique, hormone lutéinisante, cellules de granulosa, vache, brebis, ruminants

Abstract

The reproductive performance of species of agronomic interest is dependent on the careful regulation of ovarian folliculogenesis. Among the regulators involved are fibroblast growth factors (FGFs) that stimulate the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) to control the fate of the follicle and associated events such as steroidogenesis, angiogenesis and corpus luteum formation. In several non-ovarian cell types, dual specificity phosphatases (DUSPs), whose expression is induced in response to growth factors, dephosphorylate MAPKs. However, the presence and regulation of DUSPs in the mammalian ovary are poorly documented. The objectives of this thesis were (1) to determine the presence of DUSPs, (2) their regulation by FGFs and (3) their role in cow and sheep granulosa cells. In the first study in sheep, mRNAs encoding 16 DUSPs were detected and profiled in granulosa cells from antral follicles. Subsequently, *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP5* and *DUSP6* mRNA levels, as well as proteins for DUSP1 and DUSP6, were increased by FGF2 but not FGF8 or FGF18. Inhibition of DUSP1/6 and DUSP1 also suggested a role for DUSP6 in the dephosphorylation of MAPK8 in sheep. In the second study in the cow, the regulation of these three DUSPs appeared to be well conserved as *DUSP1*, *DUSP5* and *DUSP6* mRNA levels and DUSP5, DUSP6 protein levels were increased in response to FGF2. In addition, by focusing on the control of DUSP1, DUSP5 and DUSP6 expression, it was found that the accumulation of *DUSP5* and *DUSP6* mRNAs required the activation of MAPK3/1, and calcium signaling for *DUSP6* mRNA. Taken together, these data suggest that DUSP1, DUSP5 and DUSP6 are regulated in a complex manner in granulosa cells, and can be designated as phosphatases

involved in FGF signaling, thus contributing to a better understanding of the regulatory mechanisms of folliculogenesis in ruminants.

Keywords: dual specificity phosphatases, growth factors, mitogen-activated protein kinases, calcium signaling, luteinizing hormone, granulosa cells, cow, sheep, ruminants

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures	12
Liste des sigles et abréviations.....	14
Remerciements.....	22
Introduction.....	24
Chapitre 1 – Revue de la littérature.....	26
1. Folliculogenèse et régulation	27
1.1. Folliculogenèse chez les ruminants.....	27
1.2. Éléments de régulation de la folliculogenèse.....	35
1.2.1. Contrôle paracrine de la folliculogenèse basale.....	35
1.2.2. Contrôle neuroendocrinien de la folliculogenèse terminale.....	38
1.2.3. Facteurs externes.....	44
2. Facteurs de croissance fibroblastiques.....	46
2.1. Présentation des facteurs de croissance fibroblastiques.....	46
2.2. Signalisation des facteurs de croissance fibroblastiques.....	48

2.3.	Facteurs de croissance fibroblastiques et fonction ovarienne	52
3.	Signalisation des récepteurs tyrosine kinase	56
3.1.	Présentation générale des récepteurs tyrosine kinase.....	56
3.2.	Voies de signalisation activées.....	58
3.2.1.	Voie Ras/Raf/MAPK	59
3.2.2.	Voie impliquant PI3K et la PLC γ	61
3.2.3.	Voie JAK/STAT.....	63
4.	Phosphatases à double spécificité	66
4.1.	Généralités sur les DUSPs	66
4.2.	Mécanisme d'action des A-DUSPs/MKPs.....	71
4.3.	Modes de régulation des A-DUSPs/MPKs	73
4.4.	Les DUSPs dans la fonction ovarienne.....	77
Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs		80
Hypothèse et objectifs		81
Stratégie de travail et résultats attendus		82
Chapitre 3 – Article 1		84
Contribution des auteurs		85
Highlights		87
Abstract		87
1.	Introduction.....	88

2. Material and methods	90
3. Results	94
4. Discussion	97
Funding.	100
CRedit authorship contribution statement	100
Acknowledgments.....	100
References	101
Tables and figures	110
Chapitre 4 – Article 2	119
Contribution des auteurs	120
Abstract	122
Introduction	123
Materials and methods	125
Results	129
Discussion	131
Declaration of interest	134
Funding	134
Author contribution	134
Acknowledgments.....	134
Tables and figures	142

Chapitre 5 – Discussion générale.....	149
5. Discussion générale.....	150
5.1. Résumé des résultats	150
5.2. Impacts de l'étude sur le domaine.....	153
5.3. Limites de l'étude.....	154
5.4. Perspectives.....	156
Conclusion générale	160
Références bibliographiques	161
Annexes.....	204
ANNEXE 1 – Auteurs de l'article 3 en préparation	205
ANNEXE 2 – Abondance des ARNm codant pour <i>DUSP1</i> , <i>DUSP6</i> et <i>EREG</i> après stimulation par la LH	206
ANNEXE 3 – Diminution des transcrits pour <i>DUSP6</i> en présence de verteporfine, un inhibiteur ciblant des effecteurs de la voie Hippo, et de LH.....	207
ANNEXE 4 – Régulation des transcrits pour <i>DUSP1</i> et <i>DUSP6</i> par des inhibiteurs ciblant des effecteurs de la voie Hippo et par EGF.....	208

Liste des tableaux

Revue de la littérature

Tableau 1. – Caractéristiques des follicules de trois espèces agronomiques	31
Tableau 2. – Durée des phases du cycle de certains mammifères, dont la vache et la brebis	32
Tableau 3. – Expression des récepteurs à FGF dans le follicule ovarien.....	49
Tableau 4. – Expression des FGF dans les types cellulaires du follicule en fonction des sous-familles auxquelles ils sont rattachés.....	53
Tableau 5. – Liste des 25 A-DUSPs/MKPs présentes dans le génome humain	70

Article 1

Table 1. – Forward (F) and reverse (R) primers used in RT-qPCR.....	110
Table 2. – Antibodies used in Western Blot.	112

Article 2

Table 1. – Forward (f) and reverse (r) primers used in RT-qPCR.	142
--	-----

Liste des figures

Revue de la littérature

Figure 1. – Chronologie de la mise en place de la réserve ovarienne chez les femelles de quelques espèces mammaliennes.	28
Figure 2. – Les différents stades de la folliculogénèse.	30
Figure 3. – Vagues de développement folliculaire chez la vache.	34
Figure 4. – Régulation paracrine de la folliculogénèse.	35
Figure 5. – Variations hormonales au cours du cycle œstral, exemple de la vache.	41
Figure 6. – Cascade de signalisation intracellulaire induite par le pic de LH.	42
Figure 7. – Sous-familles de FGF.	47
Figure 8. – Voies de signalisation activées par les FGFs.	51
Figure 9. – Structure des RTK.	57
Figure 10. – Schéma des voies de signalisation activées par les RTK.	59
Figure 11. – Classification de la famille des DUSPs.	67
Figure 12. – Schéma de la réaction de déphosphorylation des MAPK.	72

Article 1

Fig. 1. Profile of abundance of mRNA encoding DUSP family members according to follicle size.	113
Fig. 2. FGF2 increased abundance of DUSP mRNA.	114
Fig. 3. Effect of FGF2 on DUSP mRNA and protein abundance.	115
Fig. 4. Effect of FGF8 on abundance of mRNA encoding DUSPs.	116
Fig. 5. Effects of DUSP1/6 inhibition on MAPK phosphorylation.	117

Fig. 6. Effects of inhibition of DUSP1 on MAPK phosphorylation.	118
--	-----

Article 2

Figure 1 Transient activation of MAPK3/1 phosphorylation by FGF2.	143
Figure 2 FGF2 stimulated <i>DUSP1</i> , <i>DUSP5</i> and <i>DUSP6</i> mRNA abundance.	144
Figure 3 Stimulation of DUSP5 and DUSP6 protein levels by FGF2.	145
Figure 4 Regulation of DUSP1, DUSP5, and DUSP6 mRNA abundance by mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phospholipase C (PLC), but not PKC, intracellular pathways.....	146
Figure 5 Differential regulation of <i>DUSP5</i> and <i>DUSP6</i> mRNA levels by calcium signaling.	147
Figure 6 Major intracellular pathways regulating DUSP5 and DUSP6 mRNA abundance.	148

Annexes

Figure 1. – Abondance des ARNm codant pour <i>DUSP1</i> , <i>DUSP6</i> et <i>EREG</i> après stimulation à la LH.....	206
Figure 1. – Diminution des transcrits pour <i>DUSP6</i> en présence de vertéporfine, un inhibiteur ciblant des effecteurs de la voie Hippo, et de LH.....	207
Figure 3. – Régulation des transcrits pour <i>DUSP1</i> et <i>DUSP6</i> par des inhibiteurs ciblant des effecteurs de la voie Hippo et par EGF.....	208

Liste des sigles et abréviations

A-DUSP	Phosphatases à double spécificité atypiques / Atypical dual specificity phosphatases
ADF	Actin depolymerizing factor
AP-1	Activating protein-1
ARN	Acide ribonucléique / Ribonucleic acid
CDC	Cell division cycle
CDKN	Kinase dépendante des cyclines / Cyclin dependant kinase
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire / Complementary deoxyribonucleic acid
cPLA2	Cytosolic phospholipase A2
CREB	cAMP responsive element binding protein
CYP19A1	Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1
DUSP	Phosphatases à double spécificité / Dual specificity phosphatases
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique / Epidermal growth factor receptor
EGR1	Early growth response 1
ERK	Extracellular regulated kinase
FGF	Facteur de croissance fibroblastique / Fibroblast growth factor

FGFR	Récepteur au facteur de croissance fibroblastique / Fibroblast growth factor receptor
FOXO	Forkhead box O
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
FSH	Hormone folliculo-stimulante / Folliculo-stimulating hormone
FSHR	Récepteur à l'hormone folliculo-stimulante / Folliculo- stimulating hormone receptor
GAB1	GRB2 associated binding protein 1
GDP	Guanosine diphosphate
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
GSK3	Glycogen synthase kinase
GTP	Guanosine triphosphate
HHC	Hypogonadisme hypogonadotrope congenital
HS	Sulfate d'héparane / Heparan sulfate
HSPG	Protéoglycane à héparane sulfate / Heparan sulfate proteoglycan
HuR	Human antigen R
iFGF	Facteur de croissance fibroblastique intracellulaire / Intracellular fibroblast growth factor
Ig	Immunoglobuline
IGF-1R	Insulin growth factor 1 receptor
IR	Récepteur à l'insuline / Insulin receptor

IRR	Insulin related receptor
JAK	Janus kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
Jpc	Jours post-conception / Days post-conception
KAP	Phosphatase associée aux kinases / Kinase-associated phosphatase
KIM	Kinase interaction motif
KO	Knock-out
KITL/KITLG	Kit ligand
LDLa	Domaine des récepteurs des lipoprotéines de basse densité classe A / Low-density lipoprotein receptor domain class A
LH	Hormone lutéinisante / Luteinizing hormone
LHR	Récepteur à l'hormone lutéinisante / Luteinizing hormone receptor
LHX8	LIM homeobox 8
LIF	Leukemia inhibitory factor
MAM	meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu
MAP3K/MEKK/MKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MAPKK/MEK/MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPK	Protéine kinase activée par des agents mitogènes / Mitogen-activated protein kinase

miR/miARN	Micro-acide ribonucléique / Micro-ARN ribonucleic acid
MK-STYX	Mitogen-activated protein kinase phosphoserine/threonine/tyrosine-binding protein
MKP	Mitogen-activated protein kinase phosphatase
mRNA	Acide ribonucléique messenger / Messenger ribonucleic acid
MTM	Myotubularine / Myotubularin
MTMR	Myotubularin related protein
mTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NOBOX	Newborn ovary homeobox-encoding gene
NR4A	Sous-famille de récepteur nucléaire 4 groupe A / Nuclear receptor subfamily 4 group A
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes / Platelet derived growth factor
PDGFR	Récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes / Platelet derived growth factor receptor
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PGC	Cellules germinales primordiales / Primordial germ cells
PGF2 α	Prostaglandine F2 α
PH	Pleckstrin homologue

Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKB	Protéine kinase B / Protein kinase B
PLC γ	Phospholipase C- γ
PRL	Phosphatases of regenerating liver
pT	Phospho-thréonine
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTP9Q22	Protein tyrosine phosphatase domain containing 1
PTP	Protein tyrosine phosphatase
PUM2	Pumilio 2
pY	Phospho-tyrosine
RNA	Acide ribonucléique / Ribonucleic acid
ROS	Espèces réactives de l'oxygène / Reactive oxygen species
RPS6	Ribosomal Protein S6
RTK	Récepteur tyrosine kinase / Receptor tyrosine kinase
SAM	Sterile alpha motif
SH2	Src Homology 2
SH2B/LNK/APS	Src homology 2-B
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog 4

SNP	Polymorphisme nucléotidique / Single nucleotide polymorphism
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOHLH1/2	Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1/2
SOS	Son of sevenless
SPRY	Sprouty
SSH1L	Phosphatase Slingshot Homolog 1
SSH2L	Phosphatase Slingshot Homolog 2
SSH3L	Phosphatase Slingshot Homolog 2
STAM	Signal transducing adaptor molecule 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription 2
StIP	Stress induced phosphoprotein 1
TENC1	Tensin 2 / Tensine 2
TGF β	Facteur de croissance transformant β / Transforming growth factor β
TIA-1	T-cell restricted intracellular antigen-1
TIAR	T-cell restricted intracellular antigen-1-related protein
TNS	Tensin 1 / Tensine 1
TPIP	Transmembrane phosphoinositide 3-phosphatase and tensin
TPTE	Transmembrane phosphatase with tensin homology
TTP	Tristetraprolin

TYK2	Tyrosine kinase 2
WIF	Wnt-inhibitory factor
ZP	Zone pellucide

À mes grands-mères parties trop tôt

Remerciements

Parce que sans vous cette expérience n'aurait pas été la même, merci !

Merci,

À mon directeur, **Christopher Price**, de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Votre accompagnement dans ce projet, votre sympathie, votre bonne humeur, votre disponibilité, vos conseils avisés, le partage de votre expérience et surtout vos précieuses corrections ont contribué à la qualité de la formation que j'ai reçue durant ces quatre années.

À **Francis Beaudry**, mon co-directeur, pour ses conseils lors de la préparation de mon examen de synthèse.

À **Anthony**, de m'avoir aidée à faire mes premiers pas au Québec. En arrivant ici, je me sentais déjà intégrée tant le courant était bien passé ! Merci pour le fun qu'on a eu, pour ton investissement dans mon installation ici et ma formation au laboratoire.

À **Morad, El Arbi** et **les stagiaires** avec qui j'ai partagé le travail de labo ; *thanks to you, I learned a lot about myself and the experience was bidirectional.*

À **Bruce**, pour tes visites sociales, toutes ces anecdotes et ces blagues, ta bonne humeur ... enfin ta personnalité toute entière !

À **Momo**, à **Gustavo**, qui de par votre bonne humeur et positivité sans failles m'avez aidé à garder le cap et aller jusqu'au bout.

À **Geneviève**, **Charlène** et **Christine**, pour votre sympathie et pour avoir répondu à toutes mes questions administratives.

À **Aliénor, Daryna, Elena, Esdras, Fanny, Francis, Guillaume, Manue, Marie-Charlotte, Marilyn, Nour, Olivia, Phil, Vickie**, pour votre présence tout simplement. En vous j'ai trouvé des amis prêts à m'aider en tout temps et avec qui je me suis bien amusée. Grâce à vous, ces quatre années ont été enrichissantes ; je garderai de très bons et très nombreux souvenirs de l'*after-work* grâce à vous !

À **Mathilde**, la « petite dernière » au labo avec une personnalité pleine d'énergie ! Grâce à toi les dissections ont été plus drôles, les pauses café ont retrouvé leur place dans mes longues journées : dommage que la pandémie soit passée par là...

À **Véronique T.-C.**, qui m'a instillé l'idée de faire un doctorat et m'a encouragée.

À **Yves, Julie, Danièle, Danielle**, de m'avoir transmis votre passion pour votre travail, pour vos encouragements, votre confiance dans mon travail et vos conseils qui m'ont servi tout au long de ce doctorat.

À ma famille restée en Martinique et qui m'a supportée et motivée malgré la distance : **ma mater, mon pater, ma marraine, ma tatie, mon tonton, Sylvie**, mes cousins et frères de cœur **Axel, Georgy, Manuëlle, Steeven, Teddy**, d'avoir été là en tout temps.

À **Cédric, Didi et Jordan** pour vos encouragements constants, votre support sans faille.

Enfin et non des moindres, aux organismes subventionnaires, en particulier la **Collectivité Territoriale de Martinique** et le Fonds de recherche du Québec Nature et technologies pour son support financier.

À tous : *mèsi an pil, mèsi an chay !*

Introduction

Chez les ruminants où les performances de reproduction sont aléatoires, le maintien de la fonction de reproduction représente un défi pour l'élevage (Bartlewski et al., 2011; Diskin & Kenny, 2016). Comme pour les autres mammifères, la capacité des femelles à se reproduire est conditionnée entre autres par le bon déroulement de la folliculogenèse ovarienne. Dans ce processus de croissance et de maturation du follicule ovarien, les cellules somatiques, en particulier les cellules de granulosa, jouent un rôle crucial en intégrant précocement des signaux de survie ou de mort cellulaire (Monniaux et al., 2009). Les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) figurent parmi ces stimuli qui déterminent le destin cellulaire (Z. Jiang et al., 2013; V. Portela et al., 2010). Ces facteurs de croissance agissent notamment à travers la voie des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPKs). Cette voie de signalisation consiste en une cascade de phosphorylations, et est impliquée dans l'initiation, la poursuite ou l'arrêt du développement folliculaire, ainsi que les événements qui y sont associés comme la stéroïdogenèse, l'ovulation ou encore la formation du corps jaune (Chaves et al., 2012).

L'intensité et la durée d'activité des MAPKs sont minutieusement régulées par une interaction directe avec les membres d'une sous-famille des phosphatases à double spécificité (DUSPs), les A-DUSPs/MKPs (Z. L. Jiang et al., 2011; Patterson et al., 2009). La caractérisation des A-DUSPs/MKPs est donc cruciale. À ce jour, il existe peu de données les concernant dans l'ovaire des mammifères. Plusieurs membres de ce sous-groupe sont exprimés dans les cellules de granulosa du rat et de la vache. Certains d'entre eux sont régulés par l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Herndon et al., 2016; Khan et al., 2015b, 2015a; Woods & Johnson,

2006a). Chez la poule, il existe des données quant à la régulation par le facteur de croissance transformant (TGF β) de deux de ces DUSPs (Woods & Johnson, 2006a). En revanche, pour les mammifères, les modalités de régulation des MKPs/A-DUSPs par les facteurs de croissance paracrines et autocrines ovariens sont moins explorées.

Ces travaux de thèse se basent sur l'hypothèse que des facteurs de croissance importants pour la folliculogénèse, les FGFs, peuvent réguler les A-DUSPs/MKPs, et que certaines de ces DUSPs sont indispensables à la voie de signalisation des MAPKs chez la vache et la brebis. Les objectifs des deux études qui y sont présentés sont de déterminer quelles DUSPs sont exprimées dans les cellules de granulosa, identifier celles dont l'expression est modulée par les FGFs et les modalités de cette régulation, et enfin explorer leur rôle dans la signalisation par les facteurs de croissance fibroblastiques. Étant donné que la vache et la brebis sont utilisées comme modèles en physiologie de la reproduction, avec chacune des spécificités en termes de régulation de la folliculogénèse, la réponse à ces objectifs offrira un vaste aperçu des mécanismes régulateurs dans les cellules de granulosa en réponse à des facteurs paracrines intervenant tout au long de la croissance du follicule ovarien. À termes, ces nouvelles connaissances pourraient contribuer au développement d'outils qui améliorent la fonction de reproduction de ces espèces agronomiques.

Chapitre 1 – Revue de la littérature

1. Folliculogenèse et régulation

1.1. Folliculogenèse chez les ruminants

Chez les mammifères, la mise en place de l'organisation et de la fonctionnalité des ovaires débutent dès la vie fœtale (Wear et al., 2016). L'ovaire est un organe pair du système reproducteur femelle situé dans la cavité abdominale. Sa plus petite unité structurale fonctionnelle est le follicule ovarien qui lui confère une activité à la fois endocrine et exocrine, respectivement pour la synthèse d'hormones et pour la production des gamètes femelles ou ovocytes. Les deux fonctions endocrine et exocrine sont étroitement associées dans les processus de folliculogenèse et d'ovogenèse (Saint-Dizier & Chastant-Maillard, 2014). L'ovogenèse concerne l'ovocyte et inclut la formation et le développement d'un ou plusieurs gamètes selon les caractéristiques de l'espèce. Au cours de la folliculogenèse, une succession d'évènements permet le développement et la maturation du follicule et de l'ovocyte qu'il renferme (Sánchez & Smitz, 2012; Williams & Erickson, 2000). Chacun des follicules qui entre en croissance provient d'une réserve de follicules primordiaux, également appelée réserve ovarienne. L'initiation de la croissance folliculaire se met en place selon une chronologie dépendant de l'espèce (Figure 1).

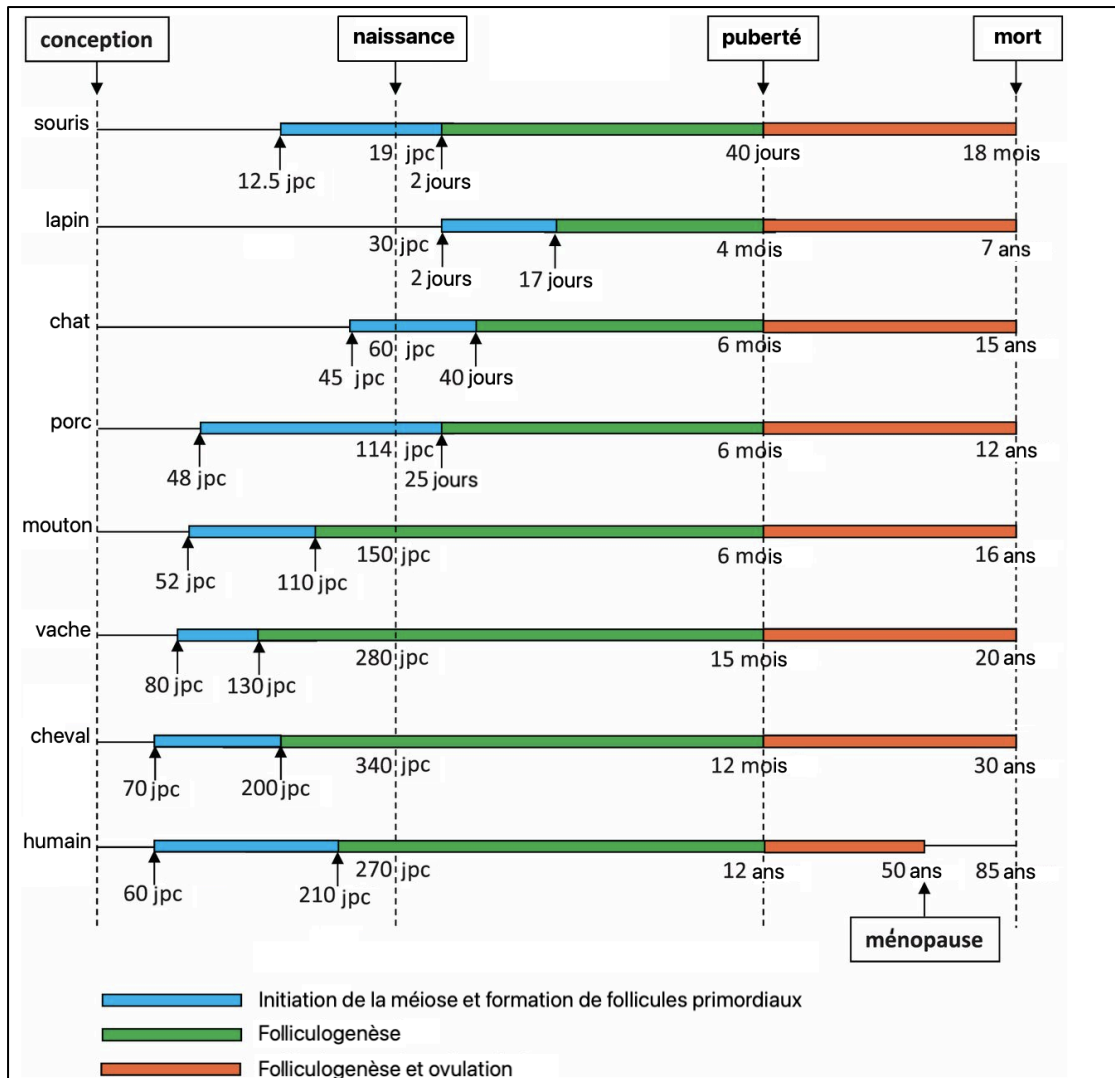


Figure 1. – Chronologie de la mise en place de la réserve ovarienne chez les femelles de quelques espèces mammaliennes. Les flèches indiquent les âges (en jours post-conception « jpc » ou en jours/mois/années après la naissance) où sont initiées la méiose et la formation des follicules primordiaux (rectangles bleus), la folliculogénèse (rectangles verts), et où la folliculogénèse et l’ovulation ont lieu (rectangles oranges). Les pointillés sont des repères pour les dates de conception, naissance, puberté et de mort ; la ménopause concerne l’espèce humaine (d’après Monniaux et al., 2014a).

La croissance folliculaire est initiée à 100jpc chez la brebis et 140jpc chez la vache, quand une cohorte de follicules primordiaux est recrutée pour se développer successivement en follicules primaires et follicules secondaires ou pré-antraux. Le passage d'un stade à l'autre est étroitement lié aux modifications structurales et fonctionnelles des cellules de granulosa : ces cellules ont été décrites comme jouant un rôle décisif dans l'activation des follicules primordiaux (Monniaux et al., 2009; Morohaku, 2019). Les cellules de pré-granulosa aplaties dans ces follicules se différencient en cellules de granulosa cuboïdales caractérisant les follicules primaires. Plusieurs études ont également montré qu'un nombre précis de ces cellules est requis pour l'initiation de la croissance folliculaire : environ 15 chez la brebis et 40 chez la vache (Braw-Tal & Yossefi, 1997; Wandji et al., 1996). Celles-ci continuent de proliférer jusqu'à entourer l'ovocyte de deux couches dans les follicules secondaires et de multiples couches dans les follicules tertiaires (Figure 2). Les follicules secondaires sont également caractérisés par la présence d'une lame basale, mise en place dans les follicules primaires, et qui entoure les cellules de granulosa, les séparant des cellules de la thèque nouvellement recrutées parmi les fibroblastes du stroma (Hirshfield, 1991).

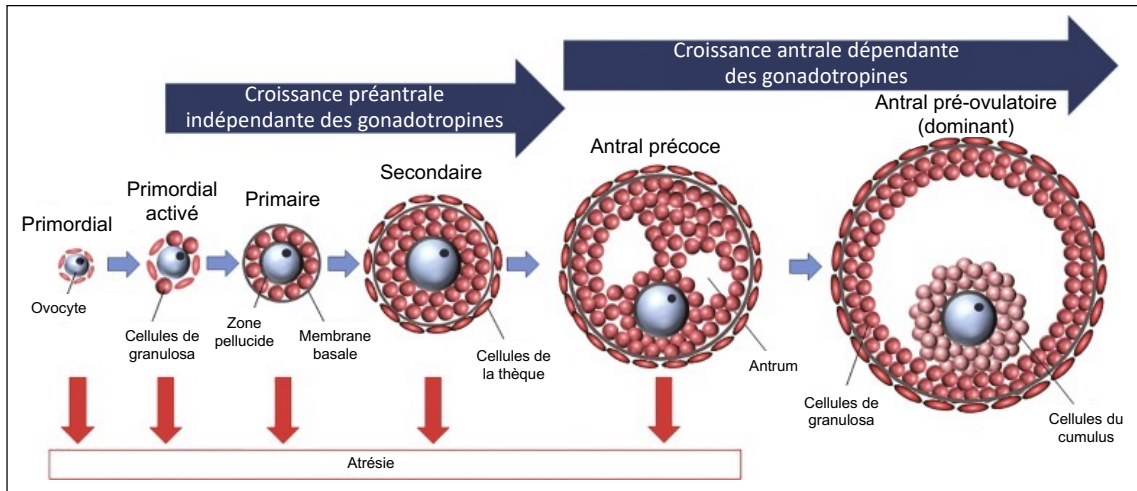


Figure 2. – Les différents stades de la folliculogénèse. La folliculogénèse est subdivisée en 2 phases, l’une indépendante des gonadotropines, permettant le développement du follicule primordial en follicule primaire puis secondaire ; l’autre, dépendante des gonadotropines permet le développement du follicule antral en follicule pré-ovulatoire depuis le follicule secondaire. À chacune des étapes de son développement, le follicule est sujet à l’atrésie (d’après Leung & Adashi, 2018).

Parallèlement à la croissance du follicule, l’ovocyte s’engage dans une différenciation supportée par les cellules de son environnement immédiat (Clarke, 2018). Ainsi, son diamètre s’accroît et la zone pellucide (ZP) se dépose autour de l’ovocyte (Chakravarthi et al., 2020). Durant sa croissance, l’ovocyte reste bloqué en prophase I de méiose. Peu avant l’ovulation, la reprise de la méiose a lieu et celle-ci ne s’achève qu’en cas de fécondation (He et al., 2021).

La transition entre follicule secondaire et follicule tertiaire est marquée par l’apparition de la cavité antrale délimitant deux populations de cellules de granulosa : les cellules de granulosa murales et les cellules de granulosa du cumulus. L’ovocyte cesse alors de croître et, la croissance du follicule se fait essentiellement par l’augmentation du volume de l’antrum. Il s’agit également du moment où les follicules passent de la

folliculogenèse basale, indépendante des gonadotropines, à la folliculogenèse terminale. Dès lors, les follicules nécessitent la présence de la FSH dans un premier temps, puis de l'hormone lutéinisante (LH) à l'apparition des récepteurs à la LH à la surface des cellules de granulosa. Les follicules évoluent ainsi successivement en follicules tertiaires ou antraux, puis follicules pré-ovulatoires synthétisant activement de l'œstradiol et renfermant un ovocyte arrêté en métaphase II (Hunter et al., 2004; Williams & Erickson, 2012). Seul un ou quelques follicules atteignent ce dernier stade ; les follicules dominants libèrent un seul ou plusieurs ovocytes au cours de l'ovulation selon que l'espèce soit respectivement mono- ou poly-ovulante (Tableau 1). Les autres dégèrent par atresie tout au long du développement folliculaire. Ce qui reste du follicule qui a ovulé dans l'ovaire (cellules de granulosa et cellules de la thèque interne) se transforme en une structure appelée corps jaune qui se maintient les jours suivants. Cette structure produit de la progestérone avant de dégénérer en absence de fécondation (Duncan, 2019).

Tableau 1. – Caractéristiques des follicules de trois espèces agronomiques (d'après Hunter et al., 2004).

Caractéristiques	Vache	Brebis	Truie
Taux d'ovulation	1	1-3	12-20
Longueur de la phase folliculaire (jours)	2-3	2-3	5-7
Diamètre du follicule ovulatoire (mm)	16-22	5-7	8-10
Diamètre maximal du follicule (mm) durant la phase lutéale	14-20	4-5	5-6
Diamètre (mm) à partir duquel les follicules dépendent des gonadotropines	3-4	2-3	3-4
Diamètre du follicule à partir duquel les cellules de granulosa acquièrent les récepteurs à la LH (mm)	9-10	3-5	5-6

Chez les ruminants, une fois la croissance initiée, une durée de 4-6 mois est nécessaire pour passer du stade de follicule primordial au stade de follicule pré-ovulatoire, soit environ trois mois pour la croissance des follicules pré-antraux et deux cycles œstraux pour celle des follicules antraux (Hunter et al., 2004; Ravindra et al., 1994; Schatten & Constantinescu, 2017; Webb et al., 2004). Le cycle œstral réfère à la cyclicité de l'activité ovarienne. Il se compose du proœstrus (développement du follicule ovulatoire), de l'œstrus (développement terminal du follicule pré-ovulatoire et ovulation spontanée), du métœstrus (formation du corps jaune) et du diœstrus (maturation du corps jaune et synthèse accrue de progestérone). Le proœstrus et l'œstrus forment la phase folliculaire ; le métœstrus et le diœstrus constituent la phase lutéale. C'est durant l'œstrus que la femelle est réceptive au mâle et qu'il peut y avoir fécondation. La longueur de chacune des phases dépend de l'espèce (Tableau 2) (Adams et al., 2012).

Tableau 2. – Durée des phases du cycle de certains mammifères, dont la vache et la brebis (d'après Saint-Dizier & Chastant-Maillard, 2014).

	Durée du cycle (jours)	Phase lutéale (jours)	Phase folliculaire (jours)	Durée de l'œstrus	Moment de l'ovulation	
					Après le début des chaleurs	Après la fin des chaleurs
Vache	21 (18-25)	17 (15-19)	4 (2-5)	20h		10-12h
Brebis	17 (15-19)	15 (14-16)	2 (2-3)	24h	18-36h	
Jument	21 (16-30)	14 (12-15)	7 (14-15)	6j (2-14)	6j	
Truie	21	14	7	55h	35-40h	
Femme	28 (24-35)	14 (12-17)	14 (12-18)		Vers le milieu du cycle	
Rate	4-5	1-2	3	9h	8-10h	

À chaque cycle œstral, deux à trois vagues de croissance des follicules antraux sont initiées chez la vache, et trois ou quatre chez la brebis (Adams, 1999; Adams et al., 2012; Ravindra et al., 1994). Cela donne lieu au recrutement d'un groupe de follicules gonado-dépendants (entre 8 et 41, avec une moyenne de 24 chez la vache) qui évoluent de manière synchrone. Au cours de chaque vague, les phases de sélection du follicule dominant et dominance de celui-ci sur les autres succèdent à la phase de recrutement (Noseir, 2003) (Figure 3).

Sous certaines conditions, le cycle œstral est suivi d'une période de non-réceptivité et d'absence d'ovulation de la femelle appelée l'anoestrus (Balasse, 2017). Dans le cas de la vache, l'anoestrus est lié à une condition physiologique particulière (soit dû au post-partum, soit dû à une pathologie). La brebis quant à elle présente un anoestrus saisonnier d'avril à août (printemps-été). Autrement, ces deux espèces ont un polyœstrus, avec plusieurs cycles œstraux qui se succèdent.

Au vu de la complexité des cycles œstraux et des différents processus qui y sont associés, en particulier le développement des follicules ovariens, on comprend bien la nécessité d'un contrôle étroit. Des éléments de régulation de la folliculogenèse sont présentés à la partie suivante.

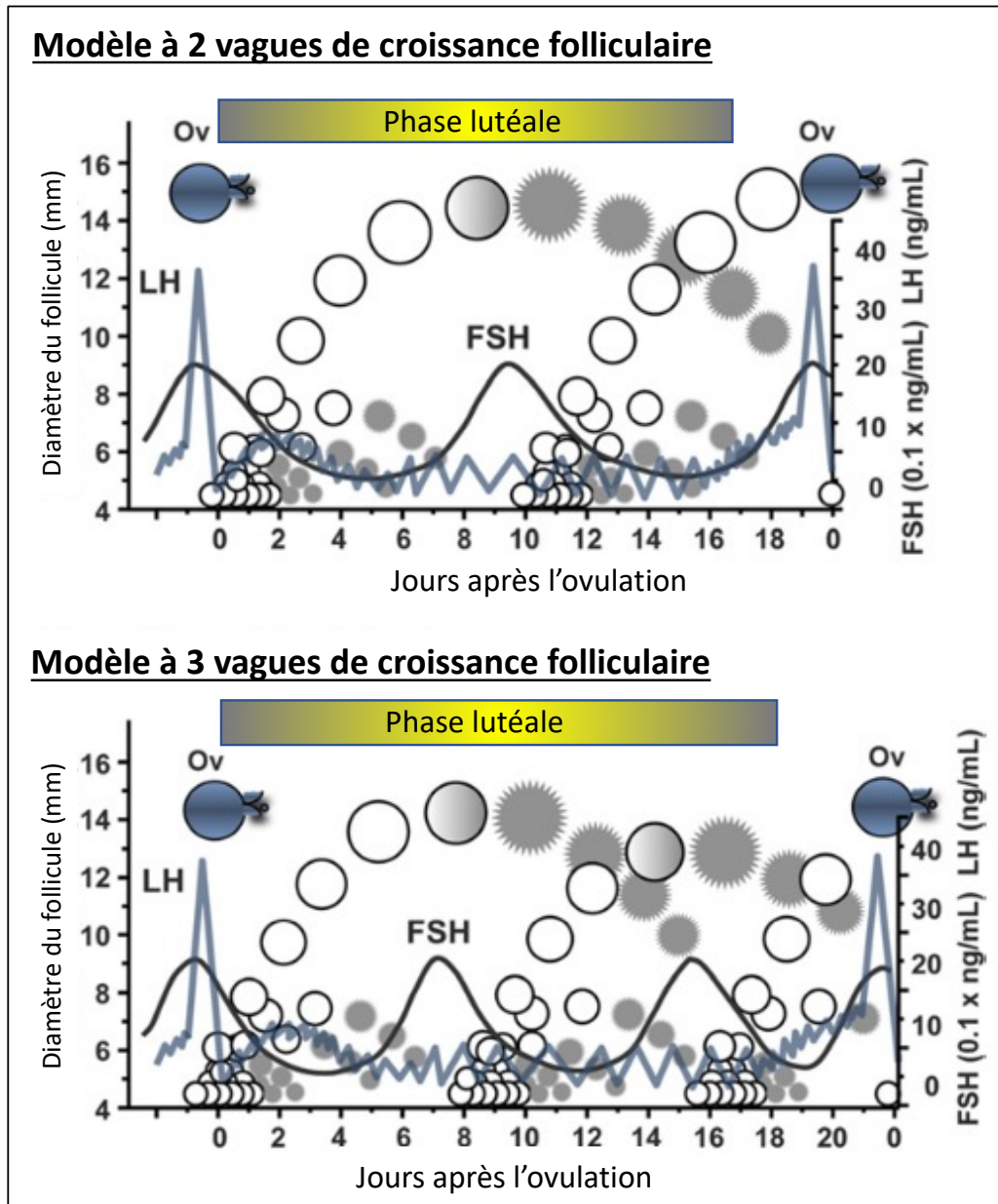


Figure 3. – Vagues de développement folliculaire chez la vache. À chaque cycle, une cohorte de petits follicules se développe, ce qui amène l'un d'entre eux à ovuler sous l'effet du pic de LH. La première vague est initiée peu après l'ovulation qui a lieu au J0 du cycle. La seconde vague a lieu à J9/J10 (cycles à 2 vagues) ou J8/9 (cycles à 3 vagues). Quand elle a lieu, la troisième vague émerge à J15/16 (Adams et al., 2012).

1.2. Éléments de régulation de la folliculogénèse

1.2.1. Contrôle paracrine de la folliculogénèse basale

Le bon déroulement de la folliculogénèse basale nécessite la coopération de tous les types cellulaires composant le follicule, à savoir les cellules somatiques et l'ovocyte. Il s'agit donc essentiellement d'une régulation paracrine permise en partie par la présence de contacts entre l'ovocyte et les cellules de granulosa¹ (Figure 4) (Pepling, 2013).

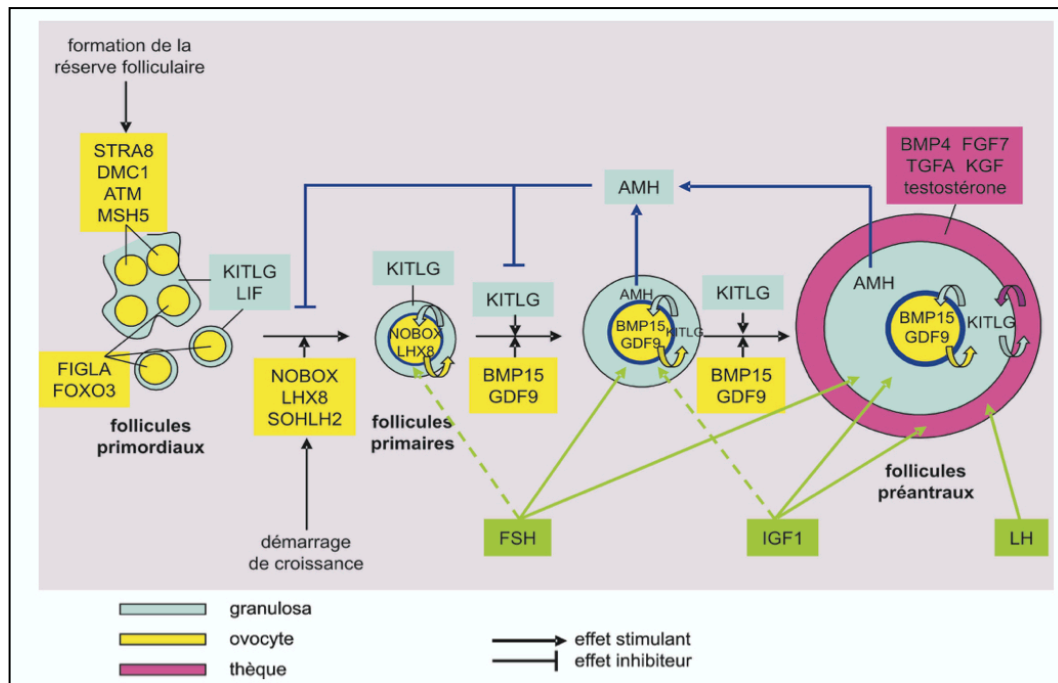


Figure 4. – Régulation paracrine de la folliculogénèse. Les cellules de granulosa, l'ovocyte ou les cellules de la thèque sécrètent des facteurs (respectivement en bleu, jaune ou rose) qui contrôlent la progression de la folliculogénèse de par leur effet stimulant ou inhibiteur. Ceci montre la coopération des trois types cellulaires du follicule dans la régulation de la folliculogénèse (Monniaux et al., 2009).

¹ Les jonctions communicantes persistent malgré la formation de la zone pellucide car les cellules de granulosa adjacentes émettent des projections cytoplasmiques appelées TZPs (*transzonal projections*).

Peu après leur formation (100jpc chez la brebis – 140jpc chez la vache), certains follicules primordiaux s'activent. Ainsi à la naissance, les ovaires contiennent des centaines de milliers de follicules allant des stades de primordial à secondaire et quelques follicules antraux, contre des milliers à la puberté (McNatty et al., 1995; Williams & Erickson, 2012; Yang & Fortune, 2008). Il est évident qu'une fine régulation existe pour empêcher un épuisement précoce de la réserve ovarienne constituée durant la vie fœtale. L'un des facteurs connu pour exercer ce rôle est l'hormone anti-Müllerienne (AMH), sécrétée principalement par les cellules de granulosa des follicules antraux, voire pré-antraux et agissant via la voie des protéines mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD). Cette hormone inhibe l'activation des follicules primordiaux et retarde la croissance des follicules aux autres stades (Fortune et al., 2011; Monniaux et al., 2014b).

Une autre voie de signalisation présente une importance pour le maintien de la réserve ovarienne : la voie PI3K/AKT. Celle-ci implique entre autres PTEN, FOXO3, PDK1 et RPS6 qui empêchent l'activation des follicules primordiaux (Monniaux et al., 2014b). Une inactivation de ces gènes dans l'ovocyte chez la souris induit un épuisement prématuré de la réserve ovarienne. En revanche, l'absence des facteurs de transcription ovocytaires telle que NOBOX, LHX8, SOHLH1, SOHLH2 conduit à une stérilité due à un blocage au stade de follicule primordial et une apoptose de l'ovocyte, ce qui montre leur rôle promoteur vis-à-vis du démarrage de la croissance folliculaire (Pepling, 2013; Z. Wang et al., 2020).

Les facteurs qui interviennent ensuite pour le développement des follicules jusqu'au début du stade antral régulent essentiellement la multiplication des cellules de granulosa par mitose, ainsi que la reprise de la méiose et la croissance de l'ovocyte. Parmi

les plus documentés, se trouve la cytokine stimulatrice KITL², produite dans les cellules de granulosa, et dont le récepteur KIT est localisé au niveau de l'ovocyte et des cellules de la thèque (Fortune et al., 2011). Le système KIT/KITL, via la voie de signalisation du PI3K, stimule la croissance de l'ovocyte, régule la prolifération des cellules de granulosa, ainsi que leur différenciation, la stéroïdogénèse, l'apoptose et l'expansion du cumulus (Sanfins et al., 2018). L'expression de cette cytokine est régulée par deux membres de la famille du TGFβ exprimés par l'ovocyte, BMP15 et GDF9 : respectivement, ils stimulent ou inhibent son expression dans les cellules de granulosa (Joyce et al., 2000; Otsuka & Shimasaki, 2002). L'analyse des phénotypes de souris KO pour *GDF9* fait ressortir une surexpression de KITL, une diminution des mitoses des cellules de granulosa aboutissant à une seule couche de cellules de granulosa cuboïdales, une absence de récepteurs à la FSH, une absence d'apoptose et une absence de thèque (Elvin et al., 1999). L'inactivation à l'état homozygote de *GDF9* bloque ainsi la croissance folliculaire au stade de follicule primaire et les animaux déficients pour ces gènes sont stériles (Clarke, 2018; Galloway et al., 2000). Le phénotype est similaire chez les brebis déficientes pour le gène *BMP15* ou alors chez qui il existe une mutation de BMP15 ou du récepteur BMPR1B (respectivement présence des gènes *FecX* ou *FecB* à l'état homozygote). Cette dernière observation contraste avec la souris où seule une sous-fertilité est observée. Il apparaît que ces facteurs sont importants en terme de régulation du quota ovulatoire et donc de différences entre espèces mono- et poly-ovulantes (R. K. Moore et al., 2004; Mottershead et al., 2015). À l'inverse de ces mutations à l'état homozygote, des niveaux réduits de BMP15 ou GDF9 ou alors des mutations hétérozygotes de *BMP15* chez la brebis résultent

² Aussi noté KITLG

en un phénotype d'hyper-proliférite dû à une augmentation du taux d'ovulation (Sanfins et al., 2018; Thompson et al., 2013). Ces phénotypes découlant d'une augmentation du taux d'ovulation ont également été reportés dans le cas de mutations hétérozygotes de *BMPR1B* (ou *ALK6*), récepteur pour BMP15, aussi appelée gène *FecB* chez la brebis (McNatty et al., 1995; Smith et al., 1993).

Les membres de la famille du TGF β jouent également un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse. En effet, BMP15 et le facteur mitogène BMP6 inhibent la production de progestérone sous l'effet de la FSH dans les cellules de granulosa, tout comme BMP4 et BMP7. Le facteur BMP6 est exprimé par l'ovocyte et les cellules de granulosa, tandis que BMP4 et BMP7 sont exprimés par les cellules de la thèque. Ces derniers, agissent grâce à la voie des SMAD et induisent, entre autres, une augmentation de l'œstradiol. En plus de son rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse, BMP7 stimule l'expression du vascular endothelial growth factor (VEGF) qui est un facteur impliqué dans la formation du réseau vasculaire du follicule (Knight & Glister, 2006; Sanfins et al., 2018).

Les facteurs paracrines et autocrines présentés ici sont ainsi un aperçu de tous ceux qui interviennent pour réguler le développement des follicules pré-antraux. Au-delà du stade pré-antral, les facteurs neuroendocrines s'ajoutent à ces facteurs paracrines pour contrôler la folliculogénèse terminale.

1.2.2. Contrôle neuroendocrinien de la folliculogénèse terminale

À partir de la puberté (6-12 mois chez la vache correspondant généralement à 200-250kg ; 6-9 mois chez la brebis), l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique ou axe HPG

devient mature (Forde et al., 2011; Jainudeen et al., 2016). En plus des facteurs paracrines, il participe à la régulation de la croissance des follicules antraux. Comme son nom l'indique, l'axe HPG met en relation trois structures. L'hypothalamus, sous l'effet de la kisspeptine, produit de la GnRH de manière pulsatile. Cette dernière stimule l'hypophyse afin qu'elle sécrète les hormones LH et FSH. Les ovaires, en particulier les cellules somatiques de la thèque et les cellules de granulosa, y répondent par la production d'hormones stéroïdes et de facteurs de croissance (Gottsch et al., 2006; Han, 2005). Les stéroïdes (œstrogènes et progestérone) produits exercent un rétrocontrôle négatif via la circulation sanguine sur les sécrétions de kisspeptine et GnRH (Balasse, 2017; Duncan, 2019; Harter et al., 2018).

Cet axe HPG est à l'origine de variations des concentrations d'hormones tout au long du cycle œstral (Figure 5). Au début de la phase folliculaire, la concentration d'œstradiol est faible, et au niveau hypophysaire, la FSH est produite sous l'effet d'une faible pulsativité de GnRH (Padmanabhan & Cardoso, 2020). Chaque nouvelle vague de croissance de follicules antraux est marquée par une élévation des niveaux de FSH. Bien que les cellules de granulosa présentent des récepteurs à la FSH dès le stade de follicule primaire jusqu'au stade pré-ovulatoire, celle-ci n'agit que lors de la croissance terminale pour permettre la maturation des follicules (Sullivan et al., 2013; Tisdall et al., 1995). En réponse à cette hormone, les follicules dominants synthétisent l'œstradiol et l'inhibine agissant dans une boucle de rétrocontrôle sur l'axe HPG afin de diminuer la sécrétion de FSH (Matsuda et al., 2012). Ceci a pour effet d'inhiber les follicules subordonnés en croissance. Parallèlement, les follicules dominants acquièrent progressivement les récepteurs à la LH au niveau des cellules de granulosa murales et des cellules de la thèque

externe des follicules pré-ovulatoires et, leur expression augmente jusqu'à l'ovulation (Duffy et al., 2019; Hsieh et al., 2007). Ceci coïncide avec une pulsativité plus élevée de la sécrétion de LH au niveau hypophysaire, ce qui induit une augmentation de la production d'œstradiol. Le follicule pré-ovulatoire est alors caractérisé par une synthèse active d'œstradiol tel que le reflètent également la forte expression de l'aromatase par les cellules de granulosa et les fortes concentrations d'œstradiol dans le fluide folliculaire (Hunter et al., 2004). L'ovulation a lieu quand le follicule dominant atteint sa taille maximale, l'œstradiol est à son maximum et la progestérone à son minimum. Les niveaux élevés d'œstradiol déclenchent alors le pic de LH par un rétrocontrôle positif sur l'axe HPG (Noseir, 2003).

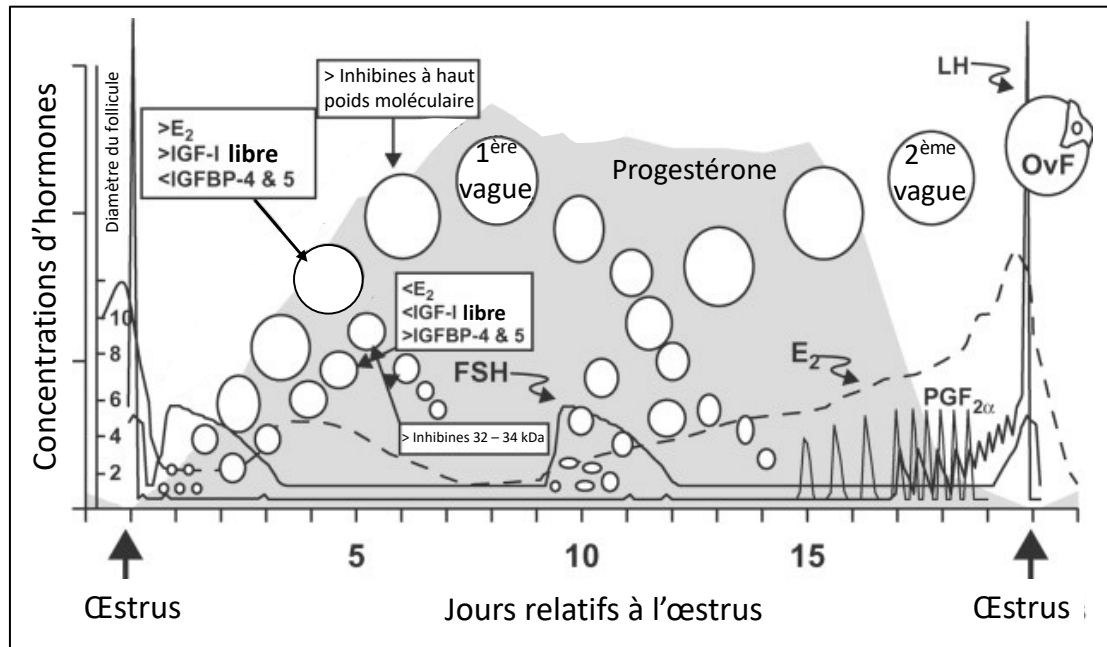


Figure 5. – Variations hormonales au cours du cycle œstral, exemple de la vache.

Chacune des deux vagues de croissance des follicules est initiée grâce à l'augmentation de la FSH. La cohorte de follicules en croissance, contrairement à ceux en régression, est caractérisée par une synthèse accrue d'œstradiol (pointillés), la disponibilité de l'IGF-1 et les inhibines de haut poids moléculaire. Mais, l'ovulation n'a lieu qu'après le pic de LH, quand l'œstradiol est à son maximum et que la progestérone est à son minimum. Ces conditions sont réunies en fin de cycle œstral quand la PGF_{2α}, dont les taux augmentent, provoque la chute du taux de progestérone (partie grisée) (d'après K. Moore & Thatcher, 2006).

Dans les follicules pré-ovulatoires, ce pic de LH initie les événements de la cascade ovulatoire. Les cellules de granulosa et de la thèque exprimant les récepteurs à la LH (LHCGR) sont d'ailleurs les premières à initier une réponse cellulaire. Au niveau des cellules somatiques des follicules matures, la LH inhibe l'expression de gènes associés à la prolifération des cellules de granulosa qui s'hypertrophient alors (Duffy et al., 2019). Parmi ces gènes on peut citer IGF-1, FSHR, ER β , la cycline D2 (Richards et al., 2002). En fait, la LH active plusieurs voies de signalisation incluant les protéines kinases A et C

(PKA et PKC), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et p38. Cette signalisation conduit rapidement à la synthèse de ligands tels que l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG) et la betacelluline (BTC) qui activent secondairement les récepteurs à l'EGF, EGFR ou ERBB (Duffy et al., 2019; Richani & Gilchrist, 2018). Ceci conduit à l'activation des voies intracellulaires classiquement stimulées par les récepteurs tyrosine kinases et, mène à l'expression d'autres gènes de la cascade ovulatoire dans les cellules de granulosa du cumulus, en particulier hyaluronan synthase 2 (HAS2), pentraxin-3 (PTX3), tumor necrosis factor alpha-induced protein (TNFAIP6), prostaglandin synthase-2/cyclooxygénase-2 (PTGS2/COX2) (Figure 6) (Hsieh et al., 2007) .

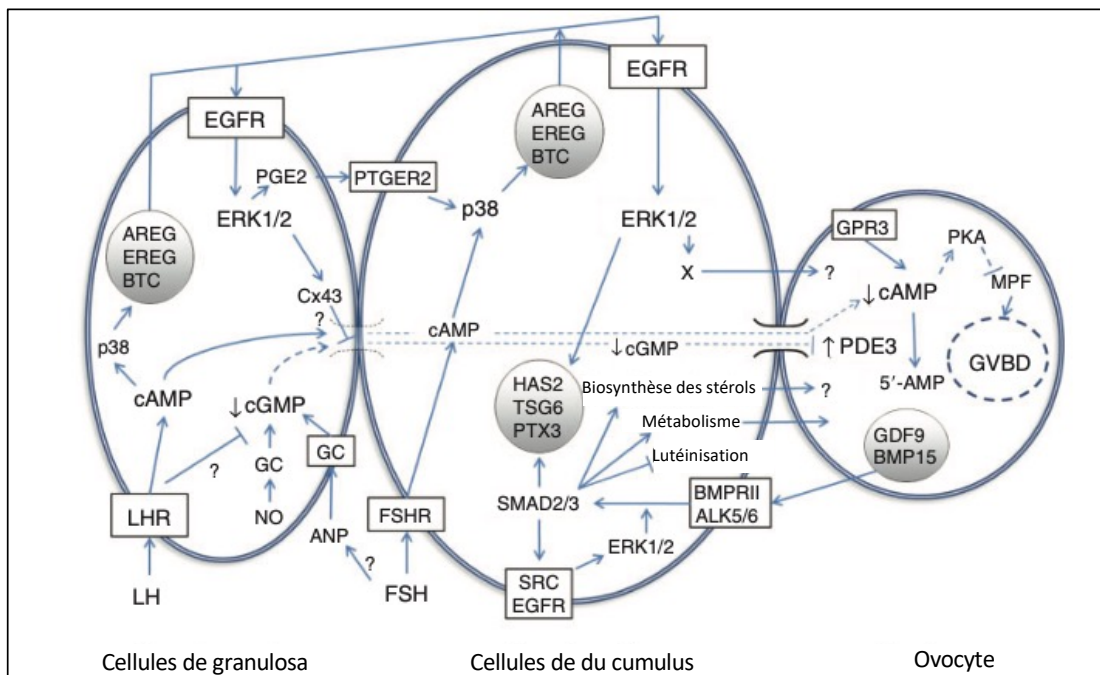


Figure 6. – Cascade de signalisation intracellulaire induite par le pic de LH. La LH induit rapidement la synthèse des ligands AREG, EREG et BTC du récepteur EGFR dans les cellules de granulosa, y compris celles du cumulus. Il s'ensuit notamment une activation de la voie des MAPKs qui mène à l'expression d'autres gènes de la cascade ovulatoire, comme HAS ou PTX3, importants pour la reprise de la méiose ou encore la rupture de la vésicule germinative (GVBD) au niveau de l'ovocyte (d'après Gilchrist, 2010).

À l'échelle du follicule, l'angiogenèse a lieu, et ce, et grâce aux voies de signalisation décrites ci-dessus, à la synthèse des prostaglandines ainsi qu'aux facteurs de croissance produits par les cellules de la granulosa et de la thèque (Duffy et al., 2019). Ces prostaglandines, avec les cytokines, chimiokines et autres facteurs autocrines ou paracrines, induisent aussi une réponse inflammatoire associée à l'augmentation de l'activité protéolytique des cellules de la thèque : tout ceci favorise la rupture de la paroi folliculaire à la surface de l'ovaire (Akison et al., 2018; Camaioni et al., 2018).

Du côté de l'ovocyte, les modifications induites par la LH juste avant l'ovulation comprennent la reprise de la méiose jusqu'au stade de métaphase II, la rupture de la vésicule germinative, la condensation des chromosomes, le réarrangement du cytosquelette, l'assemblage du fuseau méiotique puis l'expulsion du premier globule polaire (Monniaux et al., 2009).

Après l'ovulation, les cellules de granulosa et de thèque se différencient en cellules lutéales afin de former le corps jaune avec les autres types cellulaires non stéroïdogènes tels que les cellules endothéliales, fibrocytes et cellules immunitaires (Richani & Gilchrist, 2018). Le corps jaune est alors une glande endocrine transitoire impliquée essentiellement dans la synthèse de progestérone. En absence de gestation, celui-ci est amené à dégénérer sous l'effet d'une sécrétion pulsatile de prostaglandine F2 α produit par l'utérus et les cellules lutéales (Diaz et al., 2002; Shirasuna et al., 2004; Wiltbank et al., 1995).

Avec ces éléments, l'intervention des facteurs neuroendocriniens apparaît essentielle pour permettre le développement et la maturation des follicules antraux. Leur action peut toutefois être altéré par des éléments extérieurs.

1.2.3. Facteurs externes

Les facteurs externes peuvent influencer sur les paramètres de reproduction. À ce titre, le statut nutritionnel et l'alimentation peuvent être cités. Ceux-ci agissent à plusieurs niveaux de l'axe HPG et font intervenir des facteurs endocriniens d'origine non-ovarienne tels que l'insuline, la leptine et l'hormone de croissance (growth hormone ; GH), mettant donc en relation le métabolisme des glucides et l'oxydation des acides gras, avec le processus de folliculogénèse. Ainsi, chez la vache, des changements alimentaires peuvent accroître le recrutement des petits follicules antraux, leur taille, ou bien mener à un plus grand nombre d'ovulations (Armstrong et al., 2003; Gong et al., 2002). Le statut métabolique de l'animal n'est donc pas négligeable en termes de conséquences sur le cycle œstral. D'ailleurs, la vache en lactation présente une balance énergétique négative, entraînant un prolongement de l'anoestrus post-partum et des cycles œstraux anormaux (Webb et al., 2004).

La brebis quant à elle a la particularité d'être influencée par la saison et la photopériode (Yeates, 1949). En effet, les gonades s'ajustent aux variations des conditions environnementales : le passage aux jours courts dans les périodes automnale et hivernale provoque un anoestrus (Karsch et al., 1984). Aussi, l'intégration du signal lumineux est médiée par la mélatonine qui est sécrétée par la glande pinéale afin d'inhiber la sécrétion hypothalamique de GnRH, et subséquemment, celles de LH et FSH (Karsch et al., 1993; Ronayne et al., 1989). Cet anoestrus saisonnier peut être inversé chez la brebis grâce à l'effet mâle : les phéromones d'un mâle sexuellement actif sont perçues par le système olfactif de la femelle, ce qui réactive la pulsativité de LH et permet la reprise du cycle œstral (Gelez & Fabre-Nys, 2004; Martin & Scaramuzzi, 1983).

La température est un autre facteur environnemental pouvant affecter la reproduction des ruminants, en particulier la vache chez qui le stress thermique provoque un œstrus plus court et de moindre intensité. Ce facteur impacte également le développement folliculaire antral à plusieurs niveaux : les animaux exposés à la chaleur présentent des niveaux plasmatiques de FSH élevés, mais d'inhibine et d'œstradiol faibles (Hansen, 2019). Le rétrocontrôle sur l'hypophyse étant altéré, il y a une diminution du pic de LH et un impact sur l'ovulation (Roth, 2017; Wise et al., 1988). Cela se reflète directement sur le pourcentage de conception en été et en automne qui diminue de 20 à 30% (Roth et al., 2000).

La folliculogénèse, à la base de la fonction ovarienne, est donc soumise à une étroite régulation impliquant différents types cellulaires, différentes structures et différentes voies de signalisation. La folliculogénèse basale et la folliculogénèse terminale ont chacune été présentées comme régulées respectivement par les facteurs paracrines/autocrines et neuroendocrines. Cependant, l'ensemble du processus de folliculogénèse nécessite la présence des facteurs paracrines/autocrines, en particulier les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs).

2. Facteurs de croissance fibroblastiques

2.1. Présentation des facteurs de croissance fibroblastiques

Les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs) représentent un ensemble de 22 protéines, de petite taille (17 à 34 kDa), bien conservées entre les espèces (Oulion et al., 2012). Leur rôle est bien établi durant le développement embryonnaire où ils participent à la morphogenèse en régulant la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaire. Importants pour l'homéostasie, ils jouent un rôle conséquent chez l'adulte en contrôlant la régénération tissulaire, le métabolisme, le système nerveux central, l'angiogenèse et la croissance tumorale (Eswarakumar et al., 2005; Ornitz & Itoh, 2001; Powers et al., 2000).

Les FGFs sont pour la plupart autocrines ou paracrines et dits canoniques ou sécrétés, mais certains sont endocrines ou intracellulaires. Ainsi, sur la base de leur fonction, la similarité de leurs séquences et leur évolution, sept sous-familles ont été définies et sont présentées (Figure 7) (Ornitz & Itoh, 2015; Potthoff et al., 2012). Les FGFs canoniques sont représentés par les sous-familles FGF1 (2 membres ; FGF1 et FGF2), FGF4 (3 membres ; FGF4 à FGF6), FGF7 (4 membres ; FGF3, FGF7, FGF10 et FGF22), FGF8 (3 membres ; FGF8, FGF17 et FGF18) et FGF9 (3 membres ; FGF9, FGF16 et FGF20). Les FGFs endocrines eux, sont représentés par la sous-famille FGF15/19 (3 membres ; FGF15/19, FGF21 et FGF23) et les FGF intracellulaires ou iFGF par la sous-famille FGF11 (4 membres ; FGF11 à FGF14).

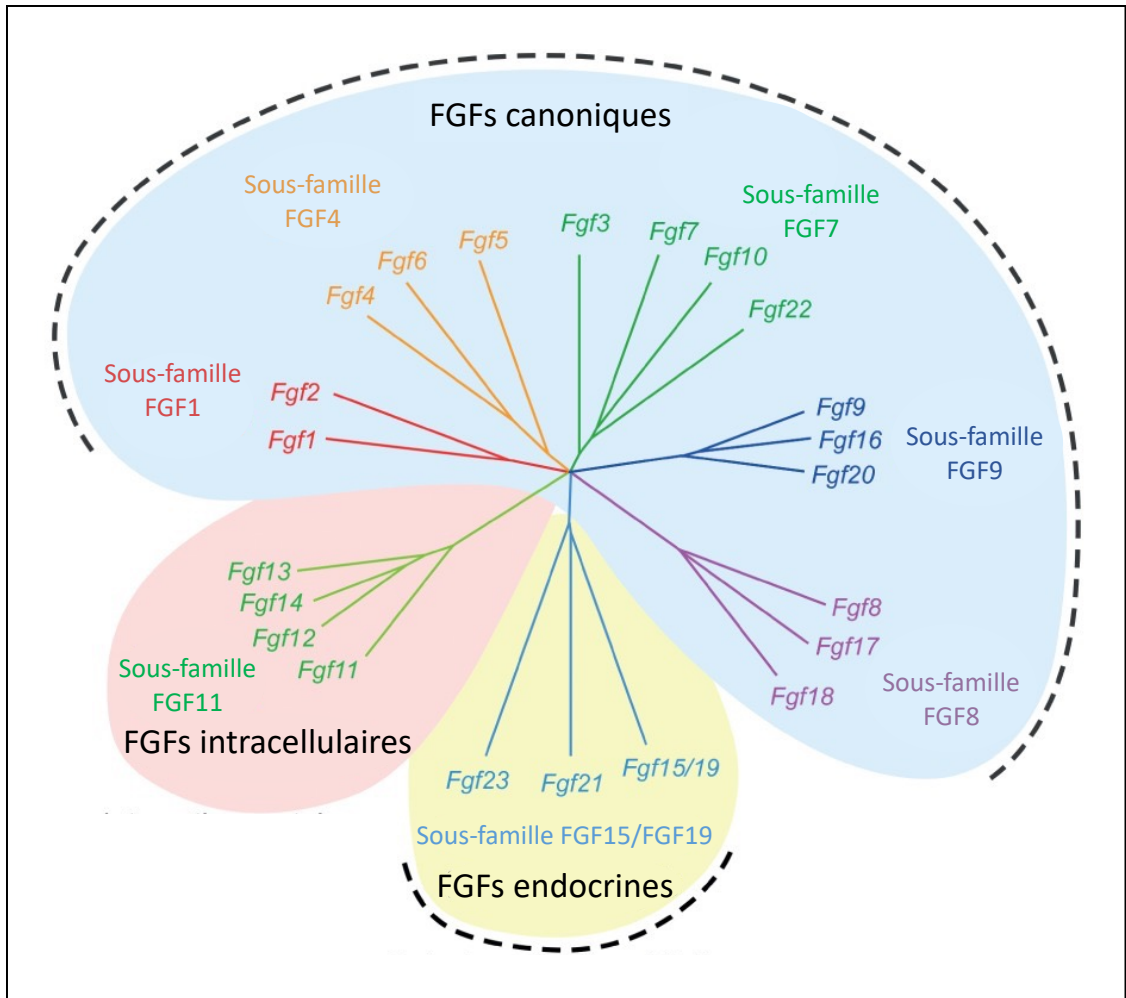


Figure 7. – Sous-familles de FGF. Les 22 FGFs connus sont représentés ici selon leur subdivision en 3 groupes (ensembles colorés en bleu, vert et orange), puis en 7 sous-familles (d'après Ornitz & Itoh, 2015).

Ces facteurs de croissance sont sécrétés dans l'espace extracellulaire de manière dépendante ou indépendante du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Le peptide signal présent dans la partie N-terminale de tous les FGF, sauf les FGF de la sous-famille FGF1 (adressés directement à la membrane plasmique) ou FGF9 (possédant une portion hydrophobe dans leur séquence les adressant au réticulum endoplasmique) leur permet ainsi de se retrouver dans la matrice extracellulaire (Beenken & Mohammadi,

2009; Prudovsky et al., 2002; Schäfer et al., 2004; Steringer et al., 2015). Puis, pour les FGF endocrines de la sous-famille FGF15 (chez la souris) /FGF19 (chez l'espèce humaine), il s'ensuit un relargage depuis la matrice extracellulaire vers la circulation sanguine, d'où leur fonction endocrine. Ceci explique également leur rôle plus large dans le métabolisme puisque contrôlant l'homéostasie du cholestérol, de la vitamine D et du phosphate (Fon Tacer et al., 2010; Somm & Jornayvaz, 2018; X. Wu et al., 2010).

2.2. Signalisation des facteurs de croissance fibroblastiques

Les FGFs exercent leur action biologique en se liant aux récepteurs pour les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFR) qui sont des récepteurs de type tyrosine kinase. Cependant, les iFGF font exception en interagissant plutôt avec des partenaires tels que la partie C-terminale des canaux sodiques, des protéines d'échafaudage pour les MAPKs, ou alors les microtubules (Fon Tacer et al., 2010; Ornitz & Itoh, 2015)

Les FGFR sont au nombre de 4, nommés FGFR1 à 4. Leur partie extracellulaire se compose de trois domaines de type immunoglobuline Ig I, II et III (Ig-like domain). Les récepteurs FGFR1 à 3 subissent un épissage alternatif des exons codant pour la seconde moitié du domaine de type Ig III, ce qui donne lieu aux variants « b » ou « c » (Yeh et al., 2003). L'expression de ceux-ci est dépendante du tissu et des cellules dont il est question. Ainsi, les variants d'épissage alternatif de type b sont généralement exprimés dans les tissus d'origine épithéliale alors que les variants de type c le sont plutôt dans les cellules d'origine mésenchymateuse (Orr-Urtreger et al., 1993; Price, 2016). Ceci affecte directement la signalisation des FGFs par leur récepteur et est à l'origine des interactions entre les cellules des deux origines (Eswarakumar et al., 2005). Le follicule ovarien est

un bel exemple de l'action paracrine des FGF du fait de la co-localisation des FGFR de type b et c puisque tous les gènes codant pour ces récepteurs y sont exprimés, sauf FGFR3b (Tableau 3). Dans cette structure, les cellules de granulosa recrutées autour de l'ovocyte pour former le follicule primordial sont d'origine épithéliale, tandis que les cellules de la thèque entrant dans la composition des follicules antraux sont, elles, d'origine mésenchymateuse (Knight & Glister, 2006).

Tableau 3. – Expression des récepteurs à FGF dans le follicule ovarien (d'après Price, 2016).

FGFR	Type cellulaire	Espèce	Référence
FGFR1b	Cumulus, ovocyte	Vache	Zhang & Ealy, 2012
FGFR1c	Cumulus, ovocyte	Vache	Zhang & Ealy, 2012
FGFR2b	Granulosa, cumulus, ovocyte	Vache	Berisha et al., 2004; Zhang & Ealy, 2012
FGFR2c	Thèque, granulosa, cumulus, ovocyte	Vache	Berisha et al., 2004; Zhang & Ealy, 2012
FGFR3c	Thèque, granulosa, cumulus	Vache	Buratini et al., 2005
FGFR4	Granulosa Thèque	Souris Vache	Puscheck et al., 1997 Buratini et al., 2005

Selon la sous-famille à laquelle il est rattaché, un FGF active un ensemble de récepteurs. Contrairement à FGF1 qui est le seul pouvant activer tous les récepteurs aux FGF, les sous-familles FGF4 et FGF8, agissent à travers les FGFR1 à 3 de type c, ainsi que FGFR4. Les membres de la sous-famille FGF7 quant à eux, se lient principalement à FGFR2b, FGFR3b et à FGFR1b pour FGF10. Concernant ceux de la sous-famille FGF9, leur action nécessite l'activation de FGFR3b et FGFR4, bien que l'activation de FGFR1, FGFR2 et FGFR3 ait aussi été rapportée (Ornitz et al., 1996; X. Zhang et al., 2006).

Les FGFs endocrines, bien qu'appartenant à la même sous-famille, présentent la particularité d'activer des récepteurs différents. Tout comme les sous-familles FGF4 et FGF18, le FGF15/19 active les FGFR1 à 3 de type c et FGFR4 (Kurosu et al., 2007; X. Wu et al., 2010). Mais, le FGF21 active les FGFR1c et FGFR3c (Suzuki et al., 2008). Le dernier membre du groupe, FGF23, active FGFR1c, FGFR3c et FGFR4 (Gattineni et al., 2011, 2014).

L'interaction des FGFs avec leurs récepteurs active plusieurs cascades de signalisation intracellulaires à l'origine de diverses réponses cellulaires (Figure 8). Celles-ci sont médiées entre autres par les protéoglycanes à sulfates d'héparane (HS ou HSPG) pour les FGFs canoniques, et les protéines Klotho α/β pour les FGFs endocrines (Matsuo & Kimura-Yoshida, 2013; Potthoff et al., 2012). Avec les récepteurs et les FGFs, les HS ou Klotho forment des trimères ce qui initie les cascades de signalisation (Hui et al., 2003). Puis, en tant que récepteurs tyrosine kinase, les FGFR se dimérisent et subissent une autophosphorylation dans leur partie intracellulaire servant alors de site d'ancrage pour la protéine adaptatrice FGFR substrate 2 (FRS2). Les phosphorylations de FRS2 par le récepteur permettent le recrutement d'autres protéines adaptatrices telles que son of sevenless (SOS), ou growth factor receptor-bound 2 (GRB2) nécessaires à l'activation de la voie des MAPKs. Les voies PI3K/AKT, par l'intermédiaire de GRB2-associated binding protein 1 (GAB1), JAK/STAT ou de la phospholipase $C\gamma$ (PLC γ) peuvent aussi être activées (Turner & Grose, 2010).

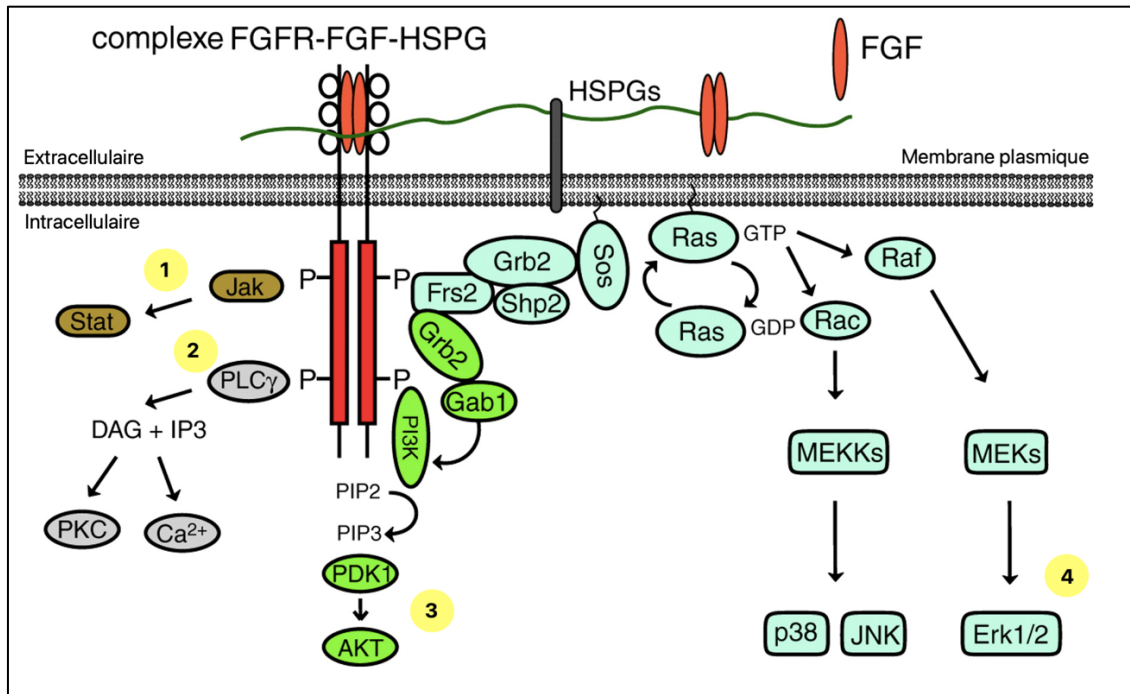


Figure 8. – Voies de signalisation activées par les FGFs. La réponse cellulaire aux FGFs peut être modulée par des HSPGs situés dans le domaine extracellulaire. Les FGFs, en se liant à leurs récepteurs (FGFR), induisent l’activation de voies de signalisation intracellulaires : (1) la voie JAK/STAT, (2) la voie de la PLC γ , (3) la voie PI3K/AKT ou encore (4) la voie des MAPK (d’après Lanner & Rossant, 2010).

Par ces mécanismes, les FGFs stimulent l’expression des gènes de réponse immédiate, incluant les facteurs de transcription NR4A, EGR1, ETS et des régulateurs négatifs de la voie tels que les membres de la famille Sprouty, les phosphatases à double spécificité dites DUSPs (Ekerot et al., 2008; Z. L. Jiang et al., 2011; Z. L. Jiang & Price, 2012; Miyoshi et al., 2010; Sugiura et al., 2011). Ce mode d’action n’est cependant pas universel, puisqu’au sein de la sous-famille FGF8, il existe des divergences d’action. En effet, la signalisation par FGF18 n’entraîne pas une augmentation des niveaux de phosphorylation de MAPK3/1 comme c’est le cas pour la plupart des FGF. Cependant, son action requiert la phosphorylation de MAPK14 (p38), ce qui est corrélé à une

apoptose observée dans une lignée de cellules cancéreuses ovariennes (Bu et al., 2006; Uma et al., 2003). De plus, dans des cellules de granulosa de vache, FGF18 n'a pas d'effet sur l'expression de gènes cibles des autres FGF tels que SPRY2 et NR4A2, mais diminue celle de GADD45B, un gène de réponse des dommages à l'ADN (Z. L. Jiang et al., 2011). Liant le récepteur FGFR3, il activerait alors des mécanismes différents qui conduisent à la mort cellulaire ou l'inhibition de la prolifération. D'ailleurs, l'expression de FGF18 est plus élevée dans les follicules atrétiques contrairement aux follicules en croissance (V. M. Portela et al., 2015). De manière similaire, il inhibe également la prolifération des cellules de l'intestin, ce qui en fait un facteur pro-apoptotique à l'inverse des autres FGFs (Amsterdam et al., 2001; Arnaud-Dabernat et al., 2008).

2.3. Facteurs de croissance fibroblastiques et fonction ovarienne

Les lieux d'expression des FGFs et de leurs récepteurs ont fort à voir avec leur fonction dans les tissus où ils sont exprimés (Eswarakumar et al., 2005). Dans le follicule ovarien, l'expression de certains membres a été rapportée (Tableau 4) et leur rôle dans la fonction ovarienne a également été souligné (Chaves et al., 2012; Price, 2016).

Tableau 4. – Expression des FGF dans les types cellulaires du follicule en fonction des sous-familles auxquelles ils sont rattachés (adapté d’après Price, 2016)

FGF	Type cellulaire	Espèce	Référence
FGF1	Thèque > granulosa	Vache	Berisha et al., 2004
FGF2	Thèque	Rat	Koos & Olson, 1989
FGF7	Thèque	Vache	Parrott et al., 1994
FGF10	Thèque, ovocyte	Vache	Buratini et al., 2007
FGF9	Thèque Granulosa	Rat Vache	Drummond et al., 2007 Grado-Ahuir et al., 2011
FGF8	Ovocyte Ovocyte, thèque, granulosa	Souris Vache	Valve et al., 1997 Buratini et al., 2005
FGF17	Ovocyte >> granulosa, thèque	Vache	Machado et al., 2009
FGF18	Thèque	Vache	Portela et al., 2010

Les facteurs de croissance fibroblastiques interviennent à tous les stades de la folliculogénèse, bien que peu de données existent quant à leur fonction dans les follicules pré-antraux. L’existence de polymorphisme nucléotidique (SNP) pour FGF8 semble indiquer un rôle dans l’activation et le nombre de follicules antraux recrutés pour entrer en maturation (Santos-Biase et al., 2012). Dans le cas de FGF7, son expression est observée dès le stade de follicule primordial jusqu’au stade de follicule secondaire chez l’espèce bovine, et il favorise la transition vers le stade de follicule primaire, tel qu’observé *in vitro* chez le rat (Buratini et al., 2007; Kezele et al., 2005). Un rôle similaire pour FGF2, seul ou en présence de la FSH, a également été rapporté chez la chèvre (Matos et al., 2007). Le contrôle de la croissance des follicules pré-antraux par FGF10 consiste, lui, en un maintien de la survie de ces follicules et la stimulation de leur croissance d’après les données obtenues avec un modèle caprin *in vitro* (Chaves et al., 2010). Ces rôles de FGF7 et FGF10 dans les follicules pré-antraux contrastent avec la détection de leur

ARNm dans les cellules de la thèque et, pour l'expliquer, il a été suggéré un changement de lieu d'expression lors du passage au stade antral (Price, 2016).

Plus tard dans la folliculogénèse, FGF7 intervient également dans les interactions entre cellules d'origine mésenchymateuse et épithéliale. En fait, la formation de la cavité antrale au sein du follicule nécessite l'action de KIT/KITL et, le facteur FGF7, sécrété par les cellules de la thèque d'origine mésenchymateuse, agit sur les cellules de granulosa d'origine épithéliale afin de permettre l'expression de KITL (Chaves et al., 2012; Driancourt et al., 2000; Parrott & Skinner, 1998).

Le rôle des FGFs est mieux documenté dans les follicules antraux, où ils interviennent essentiellement pour stimuler la prolifération des cellules de granulosa, contrôler la stéroïdogénèse et permettre la survie cellulaire (Peluso et al., 2001; Price, 2016). En particulier, le facteur de croissance fibroblastique le plus étudié, FGF2, permet la prolifération des cellules de granulosa et diminue l'apoptose et la stéroïdogénèse chez la vache et les rongeurs (Baird & Hsueh, 1986; Gospodarowicz et al., 1979; Lavranos et al., 1994). Le maintien de la viabilité des cellules de granulosa par FGF2 est permis par une signalisation impliquant la PKC et le contrôle de l'homéostasie du calcium (Peluso et al., 2001).

En ce qui concerne la stéroïdogénèse, en présence de FGF7, il a été observé une diminution de l'activité de l'aromatase CYP19A1 (Parrott & Skinner, 1998). De manière similaire, FGF17 et FGF10 régulent négativement la stéroïdogénèse. Leur expression est d'ailleurs différente selon que le follicule soit en bonne santé ou non : l'expression de FGF7 est plus importante dans les cellules de granulosa et de thèque des follicules atrophiques et, celle de FGF10 moins importante dans les cellules de la thèque de follicules

sains (Buratini et al., 2007; Machado et al., 2009). De plus, dans les follicules en croissance traités avec FGF10, il a été constaté une diminution de l'ARNm de CYP19A1 et une régression folliculaire (Gasperin et al., 2012). Aussi, FGF8 inhibe la synthèse d'œstradiol, mais reste sans effet sur celle de la progestérone (Miyoshi et al., 2010). À l'opposé, FGF9 stimule la production de progestérone dans les cellules de granulosa, ce qui est corrélé à une augmentation de la protéine STAR et de l'ARNm de P450scc (Drummond et al., 2007).

Les étapes terminales de la folliculogénèse sont elles aussi régulées par les FGFs, notamment FGF10 et FGF17. Lorsqu'ils sont ajoutés pour la maturation *in vitro* de complexes cumulus-ovocytes bovins, ils favorisent l'expansion du cumulus et l'absence de FGF10 altère ces deux processus (Machado et al., 2015; K. Zhang et al., 2010). D'autre part, l'expression de certains FGFs a été rapportée dans le corps jaune. C'est le cas notamment de FGF2 dont l'expression est stimulée par la LH mais inhibée par PGF2 α (Stirling et al., 1991). L'expression de FGF2 est plus élevée au début de la formation du corps jaune afin de permettre l'angiogénèse, mais diminue dans un second temps. Ce patron d'expression diffère de celui de FGF1, dont les niveaux sont plus élevés au cours de la phase lutéale et à la lutéolyse (Berisha & Schams, 2005; Mishra et al., 2016).

Les FGFs sont donc d'importants facteurs de croissance autocrines et paracrines dans le follicule ovarien. Les effets cellulaires qui résultent de leur action sont dépendants de l'activation de leurs récepteurs, des récepteurs de type tyrosine kinase présentés ci-dessous.

3. Signalisation des récepteurs tyrosine kinase

3.1. Présentation générale des récepteurs tyrosine kinase

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) – avec les récepteurs sérine/thréonine kinase et récepteurs histidine kinase – constituent le groupe des récepteurs protéines kinases. Ce sont des glycoprotéines dont le rôle est important dans différents organes, à différents stades du développement puisqu'elles sont impliquées dans les mécanismes de prolifération, différenciation, survie, migration, métabolisme et contrôle du cycle cellulaire (Lemmon & Schlessinger, 2010; Schlessinger & Ullrich, 1992). Plus de 60 récepteurs et leurs ligands ont été identifiés (Schuermann et al., 2018).

Leur structure comprend trois parties : un domaine extracellulaire, une hélice composant le domaine transmembranaire et une partie intracellulaire. La partie extracellulaire est unique et confère la spécificité de liaison au ligand. Elle définit l'appartenance à l'une des 20 sous-familles et peut être constituée de répétitions de fibronectine de type III, de motifs de cystéine, de domaines de type immunoglobuline, de répétitions et/ou motifs de leucine et glycine. La portion intracellulaire elle, comprend un domaine catalytique ayant une activité tyrosine kinase et des régions régulatrices juxta-membranaires (Figure 9) (Dengjel et al., 2009; Hubbard & Till, 2000).

Les caractéristiques structurales de ces récepteurs définissent deux groupes. Dans le premier se trouvent la majorité des RTK. Ceux-ci sont monocaténaires et monomériques à l'état libre, en absence de ligand. Il s'agit par exemple des récepteurs aux FGF, EGF ou encore PDGF notés respectivement FGFR, EGFR, PDGFR. Le second groupe comprend le récepteur à l'insuline IR, le récepteur relié à l'insuline IRR et le récepteur à l'IGF-1, noté IGF-1R. Ils sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques

reliées par des ponts disulfures et présentent une structure de type $\alpha_2\beta_2$, où les sous-unités α extracellulaires et les sous-unités β transmembranaires sont liées de manière covalente les unes aux autres par des ponts disulfures (Monteiro et al., 2018; Salzman et al., 1984; Sweet et al., 1987).

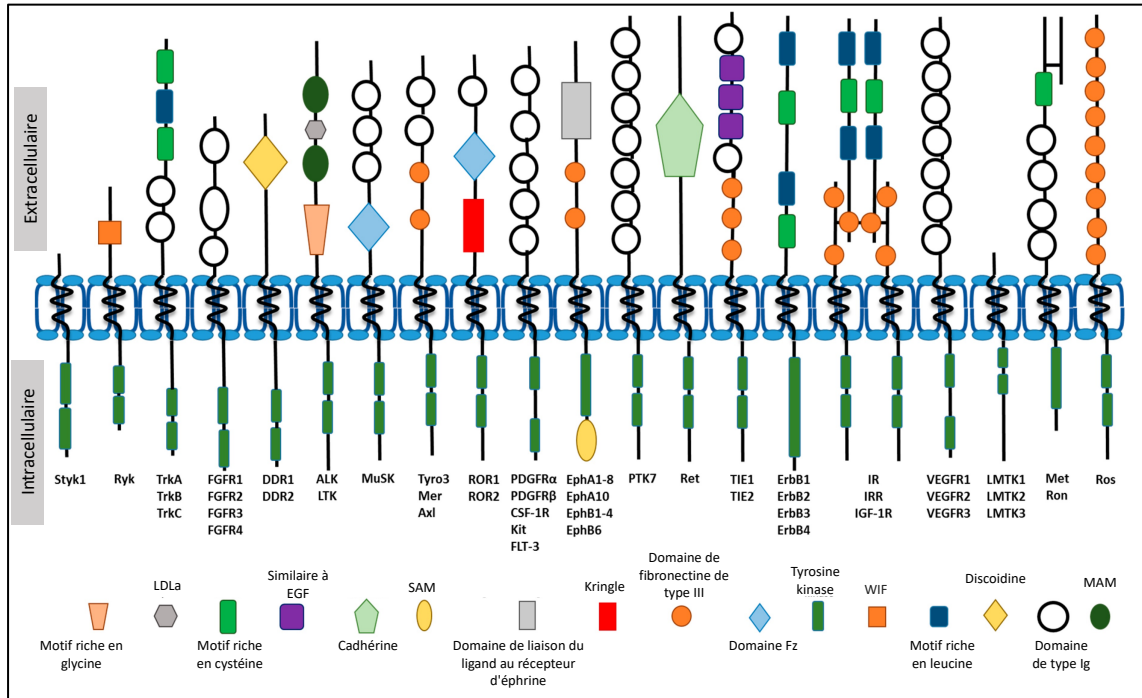


Figure 9. – Structure des RTK. Ici, sont présentées les 20 sous-familles de récepteurs de cette famille ainsi que leurs éléments structuraux. Au minimum, les RTK sont constitués d'une partie intracellulaire avec un ou des domaines tyrosine kinase (rectangles vert foncé), d'une partie transmembranaire commune et d'une partie extracellulaire où se lie le ligand. La partie extracellulaire est variable et peut contenir notamment des répétitions de fibronectine de type III, de motifs de cystéine, de domaines de type immunoglobuline, de répétitions et/ou motifs de leucine et glycine (représentés par les autres symboles géométriques explicités dans la partie basse de la figure) (d'après Critchley et al., 2018).

Les RTK possèdent une structure unique. Grâce à leur activité kinase, ils activent différentes cascades enzymatiques qui permettent l'acheminement du message extracellulaire vers le noyau, afin d'impacter l'activité cellulaire.

3.2. Voies de signalisation activées

Tout au long du développement du follicule, les récepteurs tyrosine kinase activent diverses voies de signalisation dans l'ovocyte, les cellules de la thèque, les cellules de granulosa et les cellules lutéales de différentes espèces (Schuermann et al., 2018). L'implication des RTK dans les différents processus cellulaires nécessite la liaison du ligand au domaine extracellulaire. Il s'en suit une dimérisation, puis une transphosphorylation sur des résidus tyrosine : l'activité kinase du site catalytique d'une protéine phosphoryle l'autre protéine (Wagner et al., 2013). Ceci a pour effet d'augmenter l'activité catalytique du récepteur vis-à-vis des seconds messagers intracellulaires et est à l'origine du recrutement de facteurs de transduction du signal capables d'initier la voie Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase), la voie impliquant les seconds messagers phospholipidiques via la PLC γ (phospholipase C- γ) et PI3K (phosphatidylinositol 3'-kinase), et la voie des STATs (signal transducers and activator of transcription). Les 6 acides aminés présents en position C-terminale des sites de phosphorylation conditionnent l'activation de l'une ou l'autre de ces voies (Figure 10). Ainsi, la présence d'asparagine à la position +2 d'une phospho-tyrosine favorise le recrutement de Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) et subséquemment l'activation de la voie des MAPK (Marengere et al., 1994). En revanche, une méthionine en position +3 de la

tyrosine phosphorylée entraîne la liaison de PI3K (Dengjel et al., 2009; Wagner et al., 2013). Les détails concernant chacune des voies sont explicités ci-dessous.

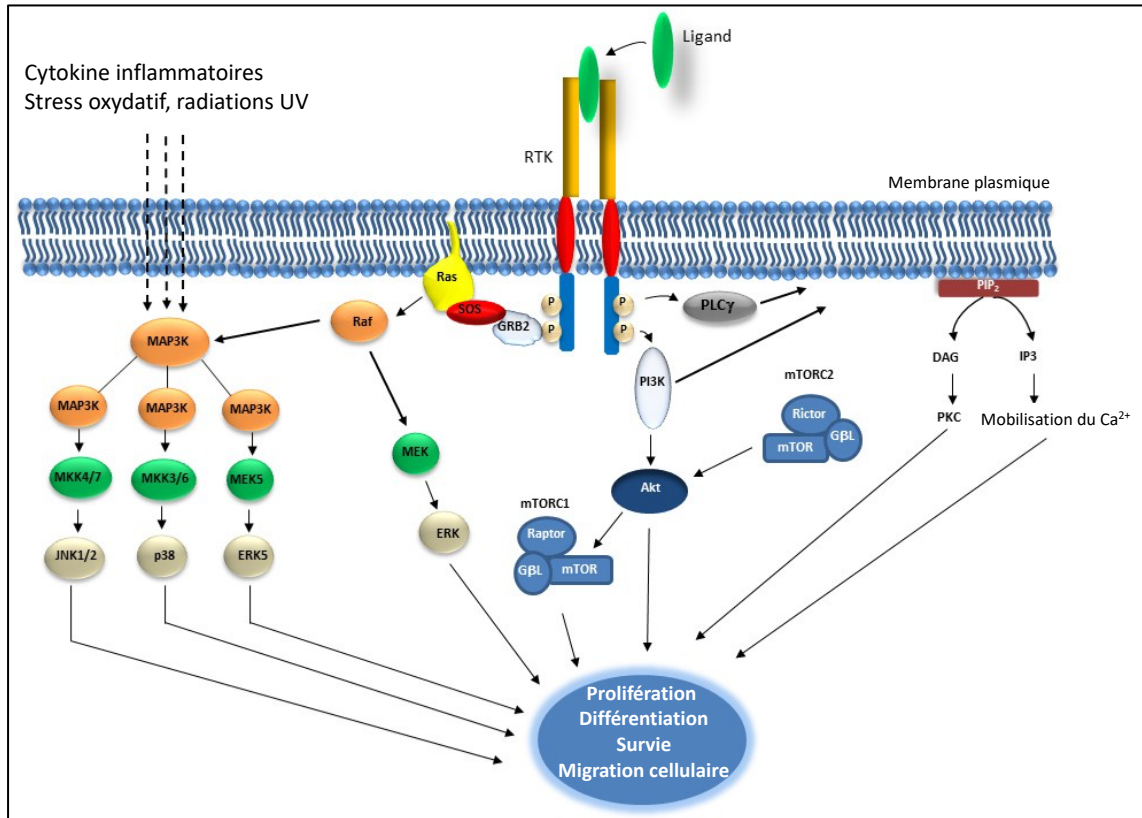


Figure 10. – Schéma des voies de signalisation activées par les RTK. La liaison du ligand au récepteur tyrosine kinase RTK permet l'activation catalytique de ce dernier, ce qui favorise le recrutement de facteurs de transduction du signal capables d'initier la voie Ras/MAPK à gauche et la voie impliquant les seconds messagers phospholipidiques via la PLCγ et PI3K à droite et au centre. Ceci a des effets sur la prolifération, la différenciation, la survie et la migration cellulaires (Regad, 2015).

3.2.1. Voie Ras/Raf/MAPK

La voie des MAPKs consiste en une cascade de phosphorylations. La signalisation intracellulaire est initiée par le recrutement de Grb2 au site de phosphorylation d'un RTK, ce qui crée un site de liaison pour l'enzyme SOS catalysant la transformation de Ras-

GDP en Ras-GTP. Le complexe Ras-GTP permet le recrutement puis l'activation de Raf, une MAPK kinase kinase (MKKK, MAP3K ou MEKK). Il existe trois membres de la famille des Raf (Raf-1, A-Raf, et B-Raf) pouvant à leur tour phosphoryler une MAPK kinase (MKK, MAPKK ou MEK) (Chong et al., 2003; Frémin & Meloche, 2010; Kolch, 2005). Chez les espèces humaine, bovine et ovine, sept MAPKK phosphorylent spécifiquement ERK1/2 (aussi MAPK3/1 ou p44/42), p38 (p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ), JNK1-3 (c-jun N-terminal kinases) et/ou ERK5 sur des résidus thréonine et tyrosine. Ainsi, MEK1 et MEK2 activent ERK1/2, MEK3 et MEK6 activent les isoformes de p38, et MEK5 active ERK5 (Brancho et al., 2003; Miyoshi et al., 2010; Peluso et al., 2001). La voie impliquant les ERK est la mieux caractérisée des voies des MAPKs (Ahmad et al., 2018). Ainsi, il est connu que l'intensité et la durée de la phosphorylation des MAPKs sont des déterminants majeurs de la réponse cellulaire qui en découle. Les modulateurs de la durée de la phosphorylation des MAPKs sont multiples et comprennent, entre autres, l'internalisation du récepteur, les membres de la famille Sprouty, SEF (Similar expression to FGF), ainsi que les DUSPs qui seront détaillés à la partie suivante (Ebisuya et al., 2005; Lake et al., 2016).

L'internalisation des récepteurs module le signal dépendamment du récepteur impliqué : le récepteur à l'EGF est connu pour subir une rapide internalisation, avant d'être dégradé et d'induire une activation transitoire de la voie. En contraste, d'autres récepteurs présentent une dynamique d'internalisation plus lente (Sorkin & Goh, 2008).

Les membres de la famille Sprouty (SPRY1-4) quant à eux, inhibent la cascade de signalisation en aval des RTK, mais en amont de l'activation des MAPKs. Leur expression est reportée pour être stimulée par les facteurs de croissance (Cabrita &

Christofori, 2008; Z. L. Jiang et al., 2011; Lake et al., 2016). En particulier, dans les cellules de granulosa bovines, SPRY1/2/4 sont induits en réponse à FGF2 (Z. L. Jiang et al., 2011).

Dans les cellules de granulosa, l'activation de cette voie est particulièrement importante pour l'ovulation. Dans les modèles murins présentant une mutation délétère de *Kras*, un membre de la famille de Ras, la prolifération des cellules de granulosa ainsi que leur différenciation est arrêtée, ce qui cause une accumulation de follicules dont la structure est anormale, et un faible taux d'ovulation. Les niveaux d'œstrogène sont faibles, mais ceux des gonadotropines sont élevés. Les cellules de granulosa ne sont ni mitotiques, ni apoptotiques. L'expression de certains gènes, notamment *LHR* et *FSHR*, y est altérée (H.-Y. Fan et al., 2008, 2012).

En outre, les souris déficientes pour MAPK3/1 ne présentent pas d'altérations du développement de leurs follicules, mais sont infertiles à cause des défauts d'ovulation. En fait, l'activation de MAPK3/1 permet la maturation de l'ovocyte, l'expansion du cumulus, la rupture de la paroi folliculaire et la différenciation des cellules de granulosa en cellules lutéales (H.-Y. Fan et al., 2009; H.-Y. Fan & Richards, 2010).

3.2.2. Voie impliquant PI3K et la PLC γ

L'enzyme PI3K présente un domaine SH2 de liaison au récepteur tyrosine kinase. Une fois recruté au niveau du récepteur, PI3K est activé. Il s'agit d'un hétérodimère composé de p85, une sous-unité régulatrice, et p110, une sous-unité catalytique. Puis, après avoir migré au niveau de la membrane plasmique, PI3K peut interagir avec Sos, ou

alors phosphoryler PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Cette dernière recrute alors PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) et une protéine kinase B/PKB ou AKT via un domaine pleckstrine-homologue PH. Avec PIP3, PDK1 participe à l'activation de AKT par phosphorylation (Alessi et al., 1996; Manna & Jain, 2015; Monteiro et al., 2018). Il existe trois membres dans la famille AKT, notés AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) et AKT3 (PKB γ) jouant respectivement des rôles prépondérants dans la croissance cellulaire et l'angiogenèse, l'homéostasie du glucose, ainsi que le développement neural (Gonzalez & McGraw, 2009). À son tour, AKT peut phosphoryler des cibles telles que les facteurs de transcription FOXO1/3/4/6, les kinases GSK3 et mTOR afin de réguler leur activité (Manning & Cantley, 2007).

Une autre composante de la signalisation par PI3K inclut le recrutement de l'enzyme PLC γ à la membrane, par l'intermédiaire d'un domaine SH2, grâce à PIP3. L'activation de PLC γ est indépendante de PI3K et permet l'hydrolyse de PIP2 en 1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Cette hydrolyse a pour effet de stimuler le relargage du calcium et d'activer la PKC ; le DAG est le principal activateur de la PKC (Nishizuka, 1992; D. Wu et al., 2009). Des modèles informatiques ont proposé que la PKC contribue à une activation prolongée de la voie des MAPK via l'activation de Raf ; il s'ensuit une production d'acide arachidonique via la phospholipase A2 cytoplasmique (cPLA2), ce qui active la PKC (Ebisuya et al., 2005).

Dans le cadre de la folliculogenèse, la voie impliquant PI3K et la PLC γ est particulièrement importante dans les premières étapes, notamment la rupture des cordons ovigères, l'activation des follicules primordiaux et la transition entre follicule primordial et follicule primaire (Brown et al., 2010; Guo & Yu, 2019). En terme de mécanismes moléculaires, le ligand Kit (KITL), via son récepteur KIT stimule la voie intracellulaire PI3K/AKT dans les ovocytes de follicules primordiaux, ce qui permet la survie des follicules et leur activation (Thomas et al., 2008; Yoshida et al., 1997). L'intervention de PTEN est également nécessaire pour contrôler l'activation des follicules primordiaux (Reddy et al., 2008). Il agit comme antagoniste de la voie PI3K/AKT en déphosphorylant PIP3 en PIP2, ce qui met fin à l'association PIP3-PDK1 au niveau de la membrane plasmique (Leung & Adashi, 2018; Reddy et al., 2009). Ainsi, PTEN et PDK1 jouent des rôles prépondérants dans le maintien de la réserve ovarienne.

3.2.3. Voie JAK/STAT

Chez les mammifères, la famille JAK (Janus Kinase) est représentée par quatre membres qui sont JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Ces protéines sont recrutées suite à l'activation puis la dimérisation du récepteur tyrosine kinase dépendamment du ligand impliqué (Rawlings et al., 2004). Les kinases JAKs phosphorylent ensuite des résidus tyrosine localisés sur le récepteur, ce qui sert de site de liaison pour les protéines possédant des domaines SH2 dans leur structure, en particulier les protéines STATs. Celles-ci, au nombre de sept (STAT1–4, 5A, 5B and 6), sont ensuite phosphorylées sur des résidus tyrosine, forment des dimères ou oligomères et servent de facteur de transcription pour des gènes cibles (Li, 2008). Les protéines SOCS (suppressor of

cytokine signaling) évitent une activation prolongée de cet axe de signalisation en se liant à phospho-JAK, au récepteur, ou aux STATs, ce qui inhibe l'activité kinase de ces dernières (Crocker et al., 2008). Les PIAS (Protein inhibitor of activated STAT) eux, peuvent bloquer le rôle de facteur de transcription des STATs en empêchant leur liaison à l'ADN, en recrutant d'autres protéines, en leur faisant subir des modifications post-traductionnelles ou en restreignant leur présence dans les compartiments cellulaires (G.-J. Niu et al., 2018).

La signalisation JAK/STAT décrite ci-dessus fait intervenir peu de seconds messagers intracellulaires. Elle est donc relativement simple comparée aux deux voies précédentes. Cependant, il existe des molécules adaptatrices pouvant contribuer à la cascade signalétique : il s'agit de STAM, StIP (STAT Interacting Protein) et les membres de la famille SH2B/LNK/APS. Les STAM (signal-transducing adapter molecules) peuvent être phosphorylées par les kinases JAK afin de faciliter la transcription de gènes cibles (Hou et al., 2002; Lohi & Lehto, 2001). Les StIP sont des protéines d'échafaudage dont le rôle serait de lier à la fois JAK et les STATs, afin de faciliter la phosphorylation des derniers par les premiers (Seif et al., 2017). Les protéines appartenant à la famille SH2B/LNK/APS, dont la transcription est induite par l'axe JAK/STAT, contiennent des domaines PH et SH2 constituant ainsi des substrats pour les enzymes JAK dont la phosphorylation mène à l'activation de la voie ou à son inhibition (Hammarén et al., 2019).

Les sites de liaisons créés par les protéines JAK au niveau des récepteurs peuvent aussi servir de sites de liaisons pour d'autres substrats tels que les kinases Shc, Src, Grb2

et PI3K contribuant ainsi à l'activation d'autres voies transverses (Rane & Reddy, 2000). Parmi les interactions les mieux caractérisées se trouvent celle avec la voie Ras/Raf/MAPK et celles avec la voie PI3K/AKT, dont il est connu que chacune des deux voies stimule l'activation de l'autre (Roskoski, 2012; Sobinoff et al., 2013). Le cas de la cytokine LIF (leukemia inhibitory factor), exprimée dans les cellules de pré-granulosa des follicules primordiaux peut être cité en exemple. En se liant à son récepteur, ce facteur active la voie JAK/STAT/SOCS dans les cellules de granulosa des follicules en cours d'activation (Sobinoff et al., 2013; Sutherland et al., 2012). Les données expérimentales chez la vache suggèrent une interaction avec la voie PI3K/AKT. En effet, dans des cellules de granulosa bovines en culture, il a été montré que LIF stimule l'expression de KITL, ce dernier activant la voie PI3K/AKT impliquée dans la survie des follicules et leur activation (Nilsson et al., 2002).

4. Phosphatases à double spécificité

4.1. Généralités sur les DUSPs

Les phosphatases à double spécificité (DUSPs) représentent une superfamille d'une soixantaine d'enzymes regroupées dans un ensemble plus large, les protéines tyrosines phosphatases ou PTP (Pavic et al., 2015). Le rôle le plus répandu de cette famille d'enzymes est d'inactiver des substrats phosphorylés au niveau des résidus serine/thréonine et tyrosine. De cette manière, les DUSPs régulent la balance phosphorylation-déphosphorylation des protéines, et ainsi l'issue des voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées (Chen et al., 2019; Patterson et al., 2009). Cette activité phosphatase ne constitue pas le seul mode de régulation de leur substrat. Les DUSPs peuvent également contrôler la localisation nucléaire ou cytoplasmique de leurs cibles, ou encore entrer en compétition vis-à-vis de la liaison avec d'autres substrats des kinases (Chen et al., 2019; Karlsson et al., 2004; Mandl et al., 2005). Certaines DUSPs possèdent également un mode d'action secondaire pour des substrats non peptidiques tels que les phosphoinositides, les ARNm, ou encore les glycanes (Pavic et al., 2015).

Au sein de cette superfamille, il existe sept sous-groupes définis sur la base de la similarité des séquences et des domaines entre les membres de la même sous-famille ainsi que la spécificité de substrat : les slingshots (3 membres), les PRL (phosphatases of regenerating liver, 3 membres), les CDC14 (cell division cycle 14 homologous, 4 membres), les PTEN (phosphatase and tensin homologous, 5 membres), les myotubularines (16 membres), les MKP (Mitogen-activated protein kinase phosphatases,

11 membres) et les DUSPs atypiques (A-DUSP, 19 membres) (Figure 11) (Alonso et al., 2004; Patterson et al., 2009).

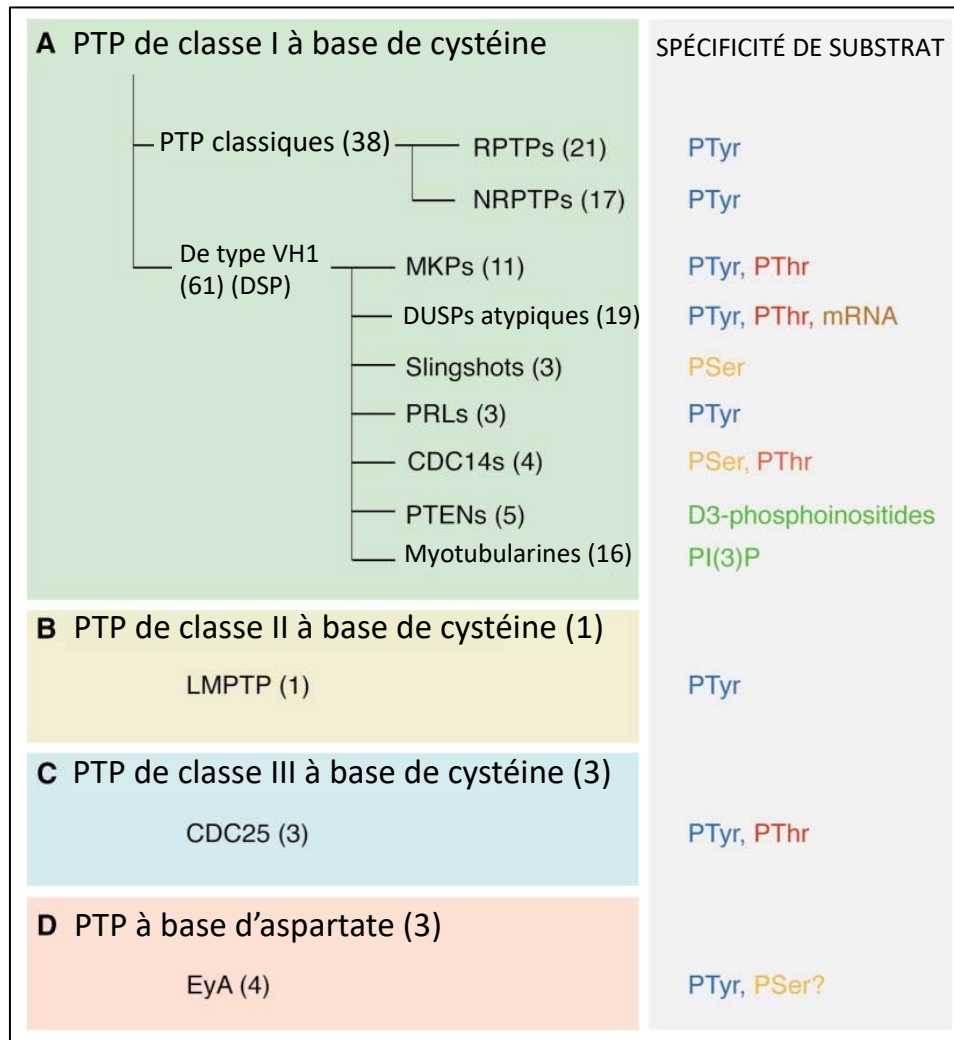


Figure 11. – Classification de la famille des DUSPs. Les protéines tyrosines phosphatases PTP sont subdivisées en 4 groupes : les PTP de classe I à III dont l'acide aminé catalytique est une cystéine (**A à C**) et les PTP dont l'acide aminé catalytique est un aspartate (**D**). Tous déphosphorylent au moins des résidus tyrosine phosphorylés. Les DUSPs sont un sous-groupe des PTP de classe I, désignées ici par « VH1-like » (d'après Alonso et al., 2004).

Les slingshots SSH1L, SSH2L et SSH3L présentent une distribution tissulaire très vaste. À l'inverse des kinases telles que LIMK1, ces phosphatases déphosphorylent la cofiline, également appelée ADF (actin-depolymerizing factor). À l'état déphosphorylée, celle-ci est impliquée dans la dépolymérisation de l'actine (DesMarais et al., 2005; Niwa et al., 2002).

Les PRL PRL-1, PRL-2 et PRL-3 sont des molécules de petite taille (environ 20kDa) ne présentant qu'un domaine catalytique (Rios et al., 2013). Les deux premières présentent une large distribution tissulaire chez l'humain tandis que l'expression de PRL-3 est limitée au cœur, au réseau vasculaire, au muscle squelettique et moindrement à la prostate (A. M. Campbell & Zhang, 2014; Hardy et al., 2018). Leur rôle dans la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion cellulaires entre autres est bien avéré, ce qui n'est pas le cas pour leurs substrats. Plusieurs cibles ont été suggérées et comprennent aussi bien des protéines que des lipides ou des glucides (Wei et al., 2018).

Les CDC14 désignent KAP (kinase-associated phosphatase) ou CDKN3 (cyclin dependent kinase inhibitor 3), CDC14A, CDC14B et une phosphatase PTP9Q22 non caractérisée (Alonso et al., 2004). La régulation du cycle cellulaire se trouve parmi les fonctions identifiées pour CDC14A et CDC14B, les mieux caractérisées de ces phosphatases, puisque leurs substrats sont les cyclines dépendantes de kinases ou CDK. Elles peuvent en effet réguler l'entrée en mitose, la maturation du centrosome, la stabilité du fuseau mitotique, la cytokinèse ainsi que la progression du cycle cellulaire (Bremmer et al., 2012).

Contrairement à la plupart des autres membres de la famille des DUSPs, ceux de la sous-famille PTENs (PTEN, TPIP, TPTE, TNS, TENC1) et les myotubularines (MTM

et MTMR1 à 15), ont pour substrats physiologiques les phosphoinositides tels que le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate et le phosphatidylinositol-3-phosphate (Alonso et al., 2004). Les phosphoinositides constituent des seconds messagers intracellulaires impliqués dans deux voies de signalisation majeures, l'axe PLC-DAG-IP3 et l'axe PI3K-AKT, impliqués dans la mort, la survie ou la prolifération cellulaire (Phan et al., 2019).

Les sous-groupes MKP et A-DUSP comprennent le plus de membres. La classification n'est pas toujours évidente pour ces sous-familles souvent regroupées en une seule, puisqu'elles partagent non seulement des éléments de structure, mais également de spécificité de substrat. Les membres de cette sous-famille sont également les seuls à être désignés par l'abréviation « DUSP » (Huang & Tan, 2012) (Tableau 5).

De manière générale, les MKPs possèdent un domaine interagissant avec la MAPK cible et sont également nommées DUSPs typiques, en opposition avec les DUSPs atypiques ne possédant pas ce domaine (ou A-DUSPs) (Huang & Tan, 2012). Toutefois, il existe quelques exceptions possédant le domaine KIM (*kinase interaction motif*) mais appartenant au groupe des MKP, ou inversement. Ces DUSPs conservent cependant pour la majorité leur activité catalytique (Huang & Tan, 2012; Patterson et al., 2009). Parmi les MKP, la localisation dans les compartiments cellulaires est également un critère de classification. Ainsi, dans le noyau on retrouve DUSP1, DUSP2, DUSP4 et DUSP5 ; les DUSP6, DUSP7 et DUSP9 quant à elles sont cytoplasmiques. À la fois localisées dans ces deux compartiments, il y a DUSP8, DUSP10 et DUSP16 (Kidger & Keyse, 2016).

Tableau 5. – Liste des 25 A-DUSPs/MKPs présentes dans le génome humain (d'après Chen et al., 2019).

Classification	Symbole du gène	Alias	Structure du domaine	Substrats MAPK
DUSPs typiques (aussi désignées par MKPs)	DUSP1	MKP1, CL100, VH1, HVH1, PTPN10		JNK, p38 > ERK
	DUSP4	MKP2, VH2, HVH2, TYP		ERK, JNK > p38
	DUSP6	MKP3, PYST1		ERK
	DUSP7	PYST2, MKPX*		ERK
	DUSP9	MKP4		ERK > p38
	DUSP10	MKP5		JNK, p38
	DUSP16	MKP7		JNK (p38?)
DUSPs typiques (non désignées par MKPs)	DUSP2	PAC1		ERK, JNK, p38
	DUSP5	VH3, HVH3		ERK
	DUSP8	HB5, VH5, HVH-5, HVH8, (Mouse: M3/6)		JNK (p38?)
DUSPs atypiques	DUSP3	VHR		
	DUSP11	PIR1		
	DUSP12	YVH1		
	DUSP13	DUSP13A, DUSP13B, BEDP, MDSP, SKRP4, TMDP		
	DUSP15	VHY		
	DUSP18	DUSP20, LMW-DSP20		
	DUSP19	DUSP17, LMW-DSP3, SKRP1, TS-DSP1		
	DUSP21	LMW-DSP21		
	DUSP22	JKAP, JSP1, VHX, LMW-DSP2, MKPX*		
	DUSP23	DUSP25, VHZ, LDP-3, MOSP		
	DUSP24	STYXL1, MK-STYX		
	DUSP27			
	DUSP28	VHP, DUSP26#		
DUSPs atypiques (aussi désignées par MKPs)	DUSP14	MKP6, MKP-L		JNK > ERK > p38
	DUSP26	MKP8, LDP-4, NATA1, SKRP3, NEAP, DUSP24#		p38 (ERK?)
<p>*, MKPX est utilisé à la fois pour DUSP7 et DUSP22. #, DUSP24 et DUSP26 sont désignées respectivement par DUSP26 et DUSP28.</p>				

4.2. Mécanisme d'action des A-DUSPs/MKPs

Le mécanisme d'action des A-DUSPs/MKPs est régi par leur structure. Celle-ci consiste en un domaine N-terminal non catalytique, à la fonction régulatrice, et un domaine C-terminal catalytique. La partie N-terminale détermine la localisation subcellulaire et permet la reconnaissance du substrat. Elle interagit directement et spécifiquement avec la MAPK cible et confère la spécificité de substrat de la phosphatase (Caunt & Keyse, 2013). Certaines présentent une spécificité envers ERK, JNK, p38 ou alors plusieurs de ces MAPK (Patterson et al., 2009). Les préférences de substrat sont variables selon le système d'étude, le type cellulaire, ou encore le contexte physiologique (Huang & Tan, 2012; Patterson et al., 2009).

Le domaine catalytique de l'enzyme est celui qui confère l'activité phosphatase. Dans le cas des DUSPs, il est situé au niveau de l'extrémité C-terminale et présente une séquence consensus du type HCXXXXXR, bien conservée au cours de l'évolution (Dickinson & Keyse, 2006). Le domaine catalytique est flexible, peu profond, mais plus large que celui des autres PTP classiques, ce qui permettrait à ces DUSPs de déphosphoryler simultanément plus de deux résidus (Farooq & Zhou, 2004). Toutefois, les descriptions de leur mécanisme d'action indiquent que la réaction de déphosphorylation se fait en deux étapes (Figure 12). Le site catalytique fait intervenir des résidus arginines, cystéines et aspartates. Au cours de la première étape, l'arginine permet de lier une phospho-MAPK via son groupement phosphate. Puis, via son atome de soufre, la cystéine établit une liaison covalente avec le phosphate. L'aspartate agit alors à titre de donneur de proton ce qui permet la libération de la MAPK déphosphorylée. Au cours de la seconde étape, l'aspartate accepte un proton d'une molécule d'eau puis, le

groupement hydroxyle restant réagit avec le phosphate. Cela conduit à la libération d'un phosphate inorganique Pi (Farooq & Zhou, 2004; Roskoski, 2012).

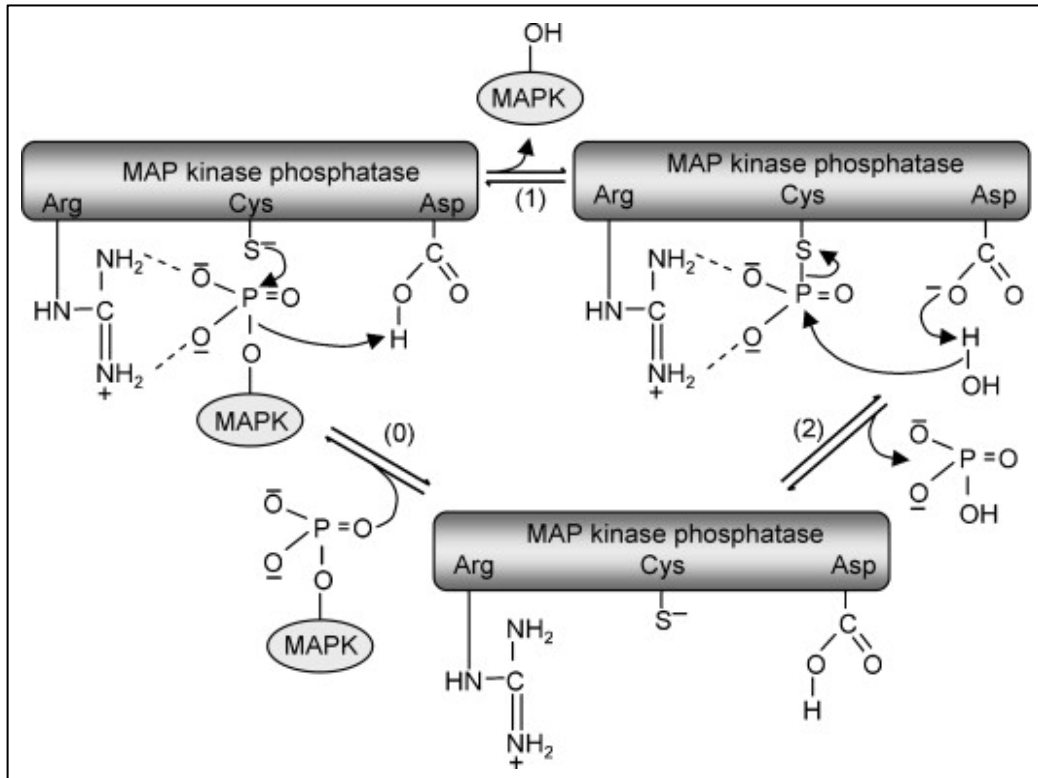


Figure 12. – Schéma de la réaction de déphosphorylation des MAPK. La déphosphorylation des MAPK par les A-DUSPs/MKPs est une réaction s'effectuant en deux temps. Lors de la première réaction **(1)**, l'arginine se lie à une phospho-MAPK via son groupement phosphate ; par l'intermédiaire de son atome de soufre, la cystéine lie le phosphate de manière covalente, ce qui permet alors à l'aspartate de donner un proton et libérer la MAPK déphosphorylée. Lors de la deuxième réaction **(2)**, l'aspartate accepte un proton d'une molécule d'eau et, le groupement hydroxyle restant réagit avec le phosphate ; un phosphate inorganique Pi est enfin libéré (Roskoski, 2012).

Bien que le site catalytique soit suffisamment profond pour accueillir les deux acides aminés, des analyses de cinétique ont montré, dans le cas de DUSP6, le résidu tyrosine (pY) de ERK2 est le premier à être déphosphorylé. Un intermédiaire réactionnel

monophosphorylé sur une thréonine (pT) est ainsi libéré. Cet intermédiaire est ensuite pris en charge par une autre DUSP6 afin d'être totalement déphosphorylé. Il semblerait donc que DUSP6 présente une préférence pour les résidus pY supérieurs à celle pour pT (Zhao & Zhang, 2001).

Pour certaines MKPs/A-DUSPs, aucune activité phosphatase envers les MAPKs n'a été rapportée ; il s'agit de DUSP13b, DUSP15, DUSP21, DUSP28 et MK-STYX. D'ailleurs, MK-STYX est définie comme une enzyme inactive, du fait de la substitution d'une cystéine par une sérine dans le domaine catalytique (Nunes-Xavier et al., 2011).

4.3. Modes de régulation des A-DUSPs/MPKs

Ces DUSPs sont d'importants facteurs régulateurs de la fonction des MAPK, des kinases impliquées dans des fonctions physiologiques diverses. Leur régulation est très complexe étant donné qu'elle peut se faire au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, ou encore post-traductionnel (Patterson et al., 2009; Pérez-Sen et al., 2019).

La régulation au niveau transcriptionnel revêt une importance particulière puisque des niveaux d'expression appropriés des MKPs/A-DUSPs sont nécessaires pour les fonctions physiologiques. Dans le cas de certains cancers ou lignées cancéreuses, une expression aberrante a été observée pour la majorité d'entre eux, en particulier pour DUSP1. Une augmentation de son expression est associée à des mélanomes, au cancer du pancréas et à celui de la prostate. En revanche, les cancers des organes endocrines reproducteurs (ovaires et testicules) sont associés à de faibles niveaux d'expression de

DUSP1 (Gumpena et al., 2018). De même, une faible expression de DUSP6 est observée dans les cas de cancers ovariens (Jeffrey et al., 2007). Ceci souligne la nécessité d'une régulation très fine de leur expression et de leur activité. En particulier la transcription des DUSPs est dépendante de l'activation des récepteurs tyrosine kinase par les facteurs de croissance selon le type cellulaire et le stimulus (Lake et al., 2016). Les premières suggestions de régulation par les facteurs de croissance ont été faites dans des études d'organogenèse, où la signalisation des FGF coïncide de manière spatio-temporelle avec l'expression de DUSP6 (Dickinson et al., 2002; Eblaghie et al., 2003). L'induction des DUSPs par des facteurs de croissance a été démontrée dans différents modèles cellulaires, notamment fibroblastiques pour DUSP4 et DUSP6 suite à une stimulation par PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ou les FGF respectivement (Ekerot et al., 2008). Ce mécanisme de régulation semble bien conservé puisque chez des espèces aussi éloignées phylogénétiquement que l'humain (neurones), le xénope (embryos) ou la poule (cellules de granulosa), DUSP1, DUSP5 et DUSP6 sont positivement régulées par des facteurs de croissance (Branney et al., 2009; Gupta et al., 2018; Woods & Johnson, 2006b).

Différents facteurs de transcription en aval de la signalisation par les facteurs de croissance, ou en réponse au stress cellulaire ont été désignés pour médier cette régulation (Camps et al., 2000). Il s'agit par exemple d'AP-1, CREB, NFκB, et la β-caténine pour DUSP1, p53 pour DUSP5, ETS-1 et ETS-2 pour DUSP6, ou encore HoxA10 pour DUSP4 (Buffet et al., 2015; Ekerot et al., 2008; Huang & Tan, 2012; Pérez-Sen et al., 2019; Ueda et al., 2003; H. Wang et al., 2007).

Certaines DUSPs ont la particularité d'être rapidement induites en réponse aux différents stimuli, ce qui suggère une régulation au niveau post-transcriptionnel. Le

contrôle de la stabilité de l'ARNm a été rapporté, notamment pour DUSP1 et DUSP6. Dans le cas de DUSP1, ce rôle est joué par les protéines de liaison à l'ARNm, HuR et NF90, qui stabilisent l'ARNm ou TIAR et TIA-1 qui en diminuent la stabilité (Kuwano et al., 2008). Aussi, HuR favorise le recrutement de l'ARNm de DUSP1 pour la traduction (Sugiura et al., 2011). La régulation de la stabilité de l'ARNm de DUSP6, elle, fait intervenir les protéines TTP (tristetraprolin) et PUM2 (Pumilio2), afin de permettre une dégradation de l'ARNm (Bermudez et al., 2011).

La régulation de l'expression des DUSPs implique également les micro-ARN (miR ou miARN). Il s'agit de petits ARN non codants, d'une taille de 21 à 25 nucléotides identifiés comme des éléments clés de la régulation de l'expression des gènes. Les miARN peuvent activer ou inhiber la transcription, contrôler la dégradation des ARNm ou alors contrôler la traduction (O'Brien et al., 2018). Il en existe plusieurs et, un même miARN peut avoir plusieurs cibles. Par exemple, miR-708 augmente l'expression de DUSP1 dans des cellules des muscles lisses des voies respiratoires ; à l'opposé miR-101 inhibe DUSP1 au niveau de l'ARNm dans les macrophages et miR-200 au niveau protéique dans les cardiomyocytes de rat (Moosavi et al., 2017).

En plus de la modulation des niveaux d'ARNm et de protéines, l'activité catalytique de ces phosphatases peut être contrôlée. La présence de la cystéine dans le site catalytique rend ces DUSPs susceptibles d'être inactivées par oxydation. Dans le cas où elle n'est pas suivie d'une dégradation, cette modification est réversible. Elle peut-être l'effet d'un stress oxydatif causé par une accumulation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) telles que H₂O₂ (Chan et al., 2008b; Kamata et al., 2005).

Il existe une autre façon plus évidente de mettre fin à l'activité catalytique des MKPs/A-DUSPs : leur dégradation. Celle-ci peut-être régulée par des modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations ou ubiquitination (Patterson et al., 2009; Xu et al., 2005). Une activation soutenue des MAPKs stimule la phosphorylation de DUSP1 sur les résidus Ser296/323 et entraîne une dégradation (Lin & Yang, 2006). De manière similaire, certains groupes ont montré que la phosphorylation de DUSP6 sur les résidus serines 159, 174 et 197 précède la dégradation de cette protéine par le complexe ubiquitine-protéasome (Bermudez et al., 2011; Jurek et al., 2009; Marchetti et al., 2005). En revanche, certaines de ces modifications ont pour finalité de les stabiliser : une phosphorylation transitoire des MAPKs cause une phosphorylation de DUSP1 sur les résidus Ser359/364 permettant la stabilisation de la phosphatase (J. M. Brondello et al., 1999; Moosavi et al., 2017). L'exemple de DUSP1 illustre l'importance des phosphorylations différentielles des MKPs/A-DUSPs. De même que des expressions aberrantes des DUSPs, une phosphorylation non appropriée de ces phosphatases est à l'origine de pathologies telles que le cancer, le diabète et les déficiences immunes (Jeffrey et al., 2007).

Les marques d'acétylation ont également été rapportées pour DUSP1. Dans les macrophages, DUSP1 est acétylé par l'histone acétyltransférase p300 sur le résidu Lys-57 localisé dans le domaine KIM. Ceci a pour effet d'augmenter son activité catalytique envers phospho-p38, et de mettre fin à la cascade inflammatoire (Cao et al., 2006). De plus, le contrôle de l'activité catalytique est possible grâce à l'interaction de la phosphatase via son domaine KIM avec la kinase cible, ce qui a pour effet d'entraîner des changements de conformation à l'origine d'une augmentation de l'activité catalytique

(Farooq & Zhou, 2004). Même si cela est valable pour DUSP1, DUSP2, DUSP6 et DUSP9, d'autres DUSPs (DUSP3, DUSP5 et DUSP10) ne nécessitent pas d'activation par leur substrat puisqu'elles sont déjà actives dans une conformation de base (Bermudez et al., 2010). Des membres d'une même sous-famille présentent donc des mécanismes de régulation a priori différents. Leur compréhension améliorerait la connaissance des différents systèmes de l'organisme, en particulier le système reproducteur féminin.

4.4. Les DUSPs dans la fonction ovarienne

La présence des DUSPs dans l'ovaire repose en partie sur les variations observées dans leur niveau d'expression dans les tumeurs ovariennes. En fait, le développement des différents cancers, notamment celui des ovaires, est associé à l'activation constitutive des MAPKs (Steinmetz et al., 2004). Le décryptage des mécanismes de contrôle qui permettent l'arrêt de l'activité des MAPKs revêt donc un intérêt particulier.

L'analyse biochimique de tissus cancéreux ovariens humains a indiqué la présence et une aberration de la régulation, entre autres, de DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP6, (Chan et al., 2008a; Denkert et al., 2002; Keyse, 2008; G. S. Wu, 2007). Le fait de retrouver ces DUSPs dans l'ovaire est à nuancer avec le contexte pathologique dans lequel se font ces études, et ne peut que suggérer leur présence et leur rôle dans un contexte physiologique.

À ce jour, la régulation physiologique directe des MAPKs par les DUSPs est peu explorée dans cet organe, et ce quelle que soit l'espèce. Chez le rat, des données de séquençage indiquent la présence des transcrits des *DUSPs 1, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 16, 18, 19, et 22* dans les cellules de granulosa de follicules pré-antraux (Herndon et al., 2016).

La contribution de certaines de ces DUSPs dans la folliculogenèse a été évalué dans une étude de 2016, dans laquelle DUSP6 a été identifiée comme une phosphatase ciblant phospho-MAPK3/1 et DUSP1 ciblant phospho-MAPK14. Dans ces travaux effectués dans les cellules de granulosa de rat, l'inactivation de DUSP6 était sous le contrôle de l'axe de signalisation FSH/PKA (Donaubauer et al., 2016). Comme mentionné précédemment, la FSH intervient durant le développement des follicules antraux pour contrôler la stéroïdogénèse. Elle active le récepteur FSHR, ce qui stimule l'accumulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) nécessaire pour l'activité de la PKA et subséquemment, la transactivation de RTK (Hunzicker-Dunn & Maizels, 2006; Sullivan et al., 2013). Chez la vache, cette signalisation par la FSH a permis l'augmentation des transcrits pour *DUSP1* dans les complexes cumulus-ovocyte, mais ceci n'a pu être corrélé aux niveau protéiques (Khan et al., 2015a, 2015b). D'autre part, l'inhibition de l'expression de *DUSP1* dans ce contexte a affecté des processus associés au développement terminal du follicule : elle a favorisé la synthèse du cholestérol nécessaire pour la stéroïdogénèse, diminué l'apoptose des cellules de granulosa du cumulus et augmenté leur prolifération. Avec l'inhibition de *DUSP1* dans ce modèle bovin, la migration des cellules de granulosa du cumulus a également été augmentée, ce qui était corrélé à la surexpression des gènes *TNFAIP6*, *PTX3*, *PTGS2*, importants pour l'expansion du cumulus (Fu et al., 2019).

Récemment, Chakravarthi et al. ont identifié chez le rat un sous-ensemble de gènes parmi lesquels se trouvait *DUSP9*, et dont la régulation était dépendante de la gonadotrophine chorionique équine (PMSG) et du récepteur aux oestrogènes β (Er β) (Chakravarthi et al., 2021). La PMSG présente une activité FSH chez les autres espèces

non équinés (Combarrous et al., 1984) ; cette étude suggère donc une régulation par la FSH d'une autre DUSP que DUSP1 ou DUSP6.

L'implication des facteurs autocrines ou paracrines dans la régulation des DUSPs est a priori peu explorée chez les mammifères. Pourtant, chez la poule, Woods & Johnson se sont intéressés à la régulation de DUSP1, DUSP5 et DUSP6. Ils ont démontré l'augmentation des niveau d'ARNm de *DUSP5* et *DUSP6* dans les cellules de granulosa aviaires en réponse à TGF α (Woods & Johnson, 2006a). Ce ligand TGF α appartient à la famille de l'EGF et active donc, comme les autres membres de cette famille, un récepteur tyrosine kinase et les voies de signalisation associées (Monteiro et al., 2018; Sorkin & Goh, 2008). Ceci a pu être observé dans leur étude avec la stimulation de la phosphorylation de MAPK3/1. Le patron de phosphorylation de MAPK3/1 a suggéré l'implication de DUSP5 et moindrement DUSP1 et DUSP6 dans le contrôle de la signalisation (Woods & Johnson, 2006a).

Tout ceci suggère que la fonction de certaines phosphatases est bien conservée à travers les espèces. Cependant, les données dans l'ovaire restent éparses et ne concernent que certaines DUSPs parmi les 23 qui peuvent potentiellement exercer un rétrocontrôle sur la voie des MAPKs.

Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs

Hypothèse et objectifs

Grâce à leur capacité à de déphosphoryler des substrats, et leur expression induite en réponse à des facteurs de croissance, les A-DUSPs/MKPs sont connues pour exercer un rétrocontrôle négatif sur la voie Ras/Raf/MAPK. Cette voie de signalisation est activée en particulier par les FGFs dans l’ovaire. Même s’il est établi que la phosphorylation des MAPKs intervient à des degrés différents et pour des durées variables selon le FGF impliqué, les modalités de la régulation de ces phosphorylations ne sont pas entièrement explorées. D’ailleurs, la présence des A-DUSPs/MKPs et leur fonction dans l’ovaire est également peu documentée. L’hypothèse de travail est donc la suivante :

Les A-DUSPs/MKPs sont régulées par les FGF et certaines d’entre elles peuvent être indispensables à la voie de signalisation des MAPK.

Afin d’étayer cette hypothèse, les objectifs de cette thèse sont :

1. Déterminer quelles DUSPs sont exprimées dans les cellules de granulosa
2. Identifier celles dont l’expression est modulée par les FGFs et les modalités de cette régulation
3. Explorer leur rôle dans la signalisation par les FGFs

Stratégie de travail et résultats attendus

Afin de répondre à ces objectifs, les cellules de granulosa ont été choisies comme modèle car au sein du follicule ovarien, ce sont les premières à intégrer les signaux de survie ou de mort cellulaire guidant alors le développement folliculaire. De plus, il est possible de les maintenir en culture sans sérum, de telle sorte qu'elles gardent leurs caractéristiques physiologiques (sensibilité à la FSH, capacité à synthétiser les stéroïdes, absence de lutéinisation).

Pour atteindre le premier objectif, les niveaux d'ARNm seront évalués par RT-qPCR dans des cellules ovines fraîchement collectées à partir de trois classes distinctes de follicules antraux. Les amorces pour la RT-qPCR ont été choisies sur la base des séquences nucléotidiques disponibles dans les bases de données, et testées dans des tissus dont l'expression des DUSPs d'intérêt est établie. Il est attendu que seulement certaines des A-DUSPs/MKPs soient exprimées, avec un profil d'expression différent selon les classes de follicules antraux d'où provenaient les cellules.

Le second objectif privilégiera une approche *in vitro*, avec plusieurs cultures de cellules de granulosa stimulées par deux FGFs anti-apoptotique FGF2 et FGF8 activant transitoirement la voie des MAPKs, et un FGF pro-apoptotique FGF18 activant la voie des MAPKs de manière prolongée ; FGF8 et FGF18 appartiennent à la même sous-famille. Ensuite, il est prévu de mesurer par RT-qPCR et immunoblot les niveaux d'ARNm de toutes les A-DUSPs/MKPs trouvées à l'objectif 1. Ici, seulement un groupe réduit de A-DUSPs/MKPs devrait être régulé de manière variable par ces FGFs. Étant donné la proximité phylogénétique de la brebis et la vache, il est attendu une similitude dans les DUSPs exprimées, et une régulation des mêmes DUSPs chez les deux espèces.

Le cas échéant, les modalités de leurs régulations seront étudiées avec le modèle de la vache, pour lequel les effets des FGFs sont bien documentés ; afin d'établir la voie de signalisation impliquée dans la régulation de l'expression des DUSPs, des éléments de chacune des trois voies connues pour être activée par les FGFs seront inhibés, avant de stimuler les cellules de granulosa de vache en culture par le/les FGF qui modulent leur expression, puis de vérifier leur expression.

Enfin, le troisième objectif prévoit une inhibition pharmacologique des DUSPs régulées par les FGFs. Les inhibiteurs seront appliqués à des cellules de granulosa ovines en culture, stimulées ou non par les FGFs. L'effet de l'inhibition de ces DUSPs sur la phosphorylation de MAPK3/1, MAPK8 et MAPK14 – classiquement activés par les FGFs choisis – sera déterminé à l'aide d'immunoblots effectués à partir des échantillons issus de cultures cellulaires. Il est attendu une modification du profil de phosphorylation des MAPKs en présence de l'inhibiteur.

Les résultats obtenus sont présentés aux chapitres 3 et 4 de cette thèse. Les deux articles qui s'y trouvent se concentrent sur plusieurs objectifs afin d'étayer l'hypothèse initiale de travail.

Chapitre 3 – Article 1

Contribution des auteurs

Lauriane Relav

Conceptualisation de l'étude

Collecte et dissection des ovaires

Entretien des cultures cellulaires

Exécution des méthodes biochimiques

Analyse formelle

Rédaction de la version originale du manuscrit

Révisions et édition du manuscrit

Anthony Estienne

Conceptualisation de l'étude

Collecte et dissection des ovaires

Révisions et édition du manuscrit

Christopher A. Price

Conceptualisation et supervision de l'étude

Rédaction de la version originale du manuscrit

Révisions et édition du manuscrit

Acquisition de fonds

Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) mRNA and protein abundance is regulated by fibroblast growth factor 2 in sheep granulosa cells and inhibits c-Jun N-terminal kinase (MAPK8) phosphorylation.

Lauriane Relav¹, Anthony Estienne² & Christopher A Price

Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, J2S 7C6, QC Canada

Correspondence should be addressed to C A Price (christopher.price@umontreal.ca)

¹Current address: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

²Current address: INRAE Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France.

Article publié

Relav, L., Estienne, A., & Price, C. A. (2021). Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) mRNA and protein abundance is regulated by fibroblast growth factor 2 in sheep granulosa cells and inhibits c-Jun N-terminal kinase (MAPK8) phosphorylation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111297. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111297>

Highlights

- Sixteen DUSP family members are expressed in sheep granulosa cells
- FGF2 increased DUSP1 and DUSP6 mRNA and protein abundance
- Neither FGF8b nor FGF18 increased DUSP expression
- Inhibition of DUSP6 increased MAPK8 (JNK) phosphorylation.

Abstract

Growth factors regulate ovarian follicle development and they signal through intracellular pathways including mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation, which is negatively regulated by a subfamily of 23 dual-specificity phosphatases (DUSP). Using sheep granulosa cells as a model, we detected mRNA encoding 16 DUSPs in vivo and in vitro. Stimulation of cells in vitro with FGF2 increased ($p < 0.05$) abundance of *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP5* and *DUSP6* mRNA, and abundance of DUSP1 and DUSP6 proteins ($p < 0.05$). In contrast, neither FGF8b nor FGF18 had any major effect on DUSP mRNA abundance. Inhibition of DUSP6 action with the inhibitor BCI significantly increased ($p < 0.05$) MAPK8 (JNK) phosphorylation but not phosphoMAPK14 (p38) or MAPK3/1 (ERK1/2) abundance. This study suggests that FGFs stimulate DUSP protein abundance, that DUSP6 regulates MAPK8 phosphorylation in granulosa cells, and DUSPs are involved in the differential MAPK signaling of individual FGF ligands.

Keywords: Ovarian folliculogenesis, Granulosa cells, FGF regulation, MAPK pathway, DUSPs, Ruminants.

1. Introduction

The successful growth of ovarian follicles requires a precise microenvironment provided by the communication between the oocyte and granulosa and theca cells. Signaling between cell types is accomplished by several families of growth factors including the fibroblast growth factor (FGF) family (Chaves et al., 2012; Price, 2016). Fibroblast growth factor 2 (FGF2) is the most studied among the 22 FGF family members and has been shown to promote granulosa cell proliferation, decrease apoptosis and inhibit steroidogenesis (Baird and Hsueh, 1986; Gospodarowicz and Bialecki, 1979; Jiang et al., 2011; Tilly, 1992). Four receptor tyrosine kinases (FGFR1-4) mediate their actions, and binding of the FGF ligand leads to phosphorylation of the receptor cytoplasmic domain, and activation of intracellular second messengers including phospholipase C-PKC, PI3K-Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (Ornitz and Itoh, 2015). The latter is the most widely activated across different cell types and consists of a phosphorylation cascade of MAPK kinases that culminates in the phosphorylation of MAPK3/1 (ERK1/2), MAPK14 (p38) and c-jun N-terminal kinase (MAPK8) (Jiang et al., 2011; Miyoshi et al., 2010; Peluso et al., 2001).

The magnitude and duration of MAPK phosphorylation directs cell fate, for example transient phosphorylation promotes cell proliferation whereas sustained phosphorylation drives cell differentiation (Caunt and Keyse, 2013; Marshall, 1995; Traverse et al., 1994). Negative feedback regulation of MAPK signaling involves receptor tyrosine kinase-induced synthesis/activation of proteins including those belonging to the Sprouty (SPRY) and dual specificity phosphatase (DUSP) families (Jiang et al., 2011; Lake et al., 2016). The action of DUSPs, a large family of over 60 enzymes, consists of

dephosphorylating serine/threonine and tyrosine residues of their substrates (Camps et al., 2000; Huang and Tan, 2012; Patterson et al., 2009). A reduced cluster of 23 DUSPs, the atypical DUSP (A-DUSP) and MAPK phosphatases (MKP), antagonizes MAPK signaling and is induced upon stimuli such as cytokines, growth factors or serum (Huang and Tan, 2012; Jeffrey et al., 2007; Patterson et al., 2009).

The regulation of SPRY family members has been explored in granulosa cells, and mRNA encoding several members, particularly SPRY2, are increased by LH and growth factors (EGF and FGF) in humans, mice and cattle (Assidi et al., 2010; Cheng et al., 2016; Sugiura et al., 2009). The regulation of DUSPs in the mammalian ovary is less clear: *DUSP1* mRNA abundance was stimulated by FSH and cAMP in bovine cumulus cells (Khan et al., 2015a, 2015b) but was inhibited by FSH in rat granulosa cells (Herndon et al., 2016). In chicken granulosa cells, DUSP5 and DUSP6 mRNA abundance was increased by TGF α in vitro (Woods and Johnson, 2006).

We hypothesized that FGFs regulate DUSP mRNA and protein abundance in sheep granulosa cells. We chose FGFs as target ligands as many (FGF1, FGF2, FGF8b) but not all (FGF18) stimulate MAPK phosphorylation and SPRY2 mRNA abundance (Jiang et al., 2013, 2011; Jiang and Price, 2012). The specific objectives of this study were to identify which DUSP family members are produced in sheep granulosa cells, to determine if they are regulated by FGFs and to explore their potential role in FGF signaling.

2. Material and methods

2.1. Granulosa cell collection from individual ewes

To assess DUSP abundance in follicles *ex-vivo*, ovaries were collected from mixed breed sheep at a local slaughterhouse and transported to the laboratory in an insulated container in saline solution and penicillin/streptomycin (Gibco™ Invitrogen, Burlington, ON, Canada) at 37°C. Ovaries from the same animal were kept together and a total of 8 animals were used. Each pair of ovaries was dissected to provide separate pools of small (1 to 3 mm), medium (3 to 5 mm) and large (more than 5 mm) antral follicles corresponding to follicle growth, selection, and dominance stages, respectively (Estienne et al., 2015). Follicles were hemisected in McCoy's 5a medium (Gibco™ Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The follicle walls were scraped to recover granulosa cells in the medium, and cells from all follicles of each size class from each ewe were pooled and collected by centrifugation at 980 g for 15 min and the pellet was recovered in commercial lysis buffer containing 2-mercaptoethanol before proceeding with RNA extraction (Invitrogen).

2.2. Cell culture

To assess the effects of growth factors on DUSP mRNA and protein abundance, we employed a serum-free granulosa cell culture system that maintains an estrogenic phenotype in which cells remain responsive to FSH (Campbell et al., 1996). All the reagents were from Invitrogen (Gibco™), except where mentioned. Briefly, at least 12 sheep ovaries with clearly visible follicles were collected from a local abattoir and transported to the laboratory. Small and medium antral follicles (1 to 4 mm diameter)

were isolated and bisected in DMEM:F12 to create a granulosa cell suspension. After filtration through a 150 mesh filter (Sigma-Aldrich) and centrifugation at 980 g for 15 min, the cell pellet was resuspended in culture medium composed of McCoy's 5a supplemented with 10 mmol/l sodium bicarbonate, 0.1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), 4 ng/ml sodium selenite, 2.5 µg/ml apotransferrin, 1 µg/ml fungizone, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1.1 mmol/l nonessential amino acid solution, 10^{-6} M androstenedione, 25 mM HEPES, 10 ng/ml insulin and 10 ng/ml ovine FSH (starting at the first culture medium change ; AFP5346D, National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA, USA). The cells were plated at a density of 1×10^6 per ml per well in a 24-well plate (Corning™ Costar™ Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) and kept at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Every 48 h, 70% of the spent culture medium was renewed.

Two wells were used for RNA extraction and four wells were used for immunoblotting per treatment, and the samples were combined to form a single datapoint. All cultures were performed on at least three cell pools obtained from ovaries collected on different days.

2.3. Treatments with inhibitors and hormones

All treatments were applied on day 5 of culture, and cells harvested at the times indicated in the figures. Recombinant human FGF2, FGF8b and FGF18 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) were added to wells in 2 µl medium to achieve concentrations of 0, 1, 10 and 100 ng/ml. Pairwise sequence alignment with EMBOSS indicated the recombinant proteins share more than 90% similarity with the corresponding ovine

protein (Needleman and Wunsch, 1970). The role of DUSP was investigated using commercially available inhibitors targeting either DUSP1/6 (3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-2-(phenylmethylene)-1H-inden-1-one, BCI; 5 μ M; Cayman Chemical, Burlington, ON, Canada), or DUSP1 alone (Triptolide, TPL; 10 μ M; Cayman Chemical, Burlington, ON, Canada) (Herndon et al., 2016; Koo et al., 2009; Molina et al., 2009). The inhibitors were applied in 5 μ l DMSO 1 h before treating cells with 10 ng/ml of FGF2 for the indicated times, and controls received vehicle alone.

2.4. Total RNA extraction and real-time qPCR

After treatments, the culture medium was discarded, and total RNA was extracted from cells with the PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration and purity was assayed using a Nanodrop 1000. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed into cDNA using SuperScript™ IV VILO™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme (Invitrogen). Quantitative PCR was performed on a CFX96 Touch thermocycler (Bio-rad, Hercules, CA, USA) using 1X Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad) and 375 nM or 250 nM of each specific forward and reverse primer in a total reaction volume of 20 μ l. The sequences used to assay mRNA abundance in granulosa cells are presented in Table 1. Thermocycling conditions were 95°C for 3 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. Preliminary sample dilution curves were performed to determine conditions for optimal amplification efficiency. Novel amplicons were sequenced to verify authenticity and melting curve analysis was used to verify a single product was amplified in each run. Each reaction was performed in duplicate and the

average threshold cycle (Ct) value was used to determine the mRNA quantity of target genes relative to the geometric mean of three housekeeping genes (*RPL19*, *SDHA* and *YWHAZ*) with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and correction for amplification efficiency (Pfaffl, 2001). These reference genes have been validated for use in sheep granulosa cells (Drouilhet et al., 2013; Estienne et al., 2015; Monniaux et al., 2020; Pierre et al., 2016).

2.5. Western blot

After treatments, the culture medium was discarded, and cells were lysed with RIPA buffer (1X phosphate buffered saline pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and proteases and phosphatases inhibitor cocktails). The lysate was centrifuged at 13 000 g for 10 min, and protein concentrations were determined by BCA assay following the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Ten μ g of total protein was loaded in 4-15% stain free gels (Bio-rad). The proteins were resolved by migration at 200 V under constant amperage for 40 min using a Tetra cell apparatus (Bio-rad), and were then transferred to a LF-PVDF membrane in a semi-dry transfer system (TransBlot; Bio-rad). The membranes were blocked and incubated with antibodies as indicated in Table 2. Each incubation period was followed with 3 washes of 5 min each in TTBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5). The signal was detected by chemiluminescence with ECL or ECL max (Bio-rad). For each protein, intensities were calculated relative to a calibrator sample, and the calibrated intensity was normalized to the loading control β -actin (for DUSP) or the corresponding total protein for phospho-MAPKs.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.3 (San Diego, California USA). Data are presented as mean \pm SEM of 8 ewes or, for cell culture experiments, at least 3 independent cell cultures. One-way ANOVA followed by Fisher's LSD post-hoc test was used to compare mRNA abundance in granulosa cells across different stages of folliculogenesis, and two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test or t-test was performed to assess the effect of FGF treatment on mRNA and protein abundance in vitro. Means were considered different if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. DUSP mRNA profile in ovine granulosa cells from different sizes of follicles

We first determined by RT-PCR which DUSP were present in ovine granulosa cells among the 23 known A-DUSP and MKP members. Sixteen DUSP family members were detected in granulosa cells, specifically *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP3*, *DUSP5*, *DUSP6*, *DUSP7*, *DUSP8*, *DUSP10*, *DUSP11*, *DUSP12*, *DUSP14*, *DUSP15*, *DUSP16*, *DUSP18*, *DUSP19* and *DUSP22*. Among these, the abundance of three was different ($p < 0.05$) between granulosa cells of small, medium or large follicles (Fig. 1). Abundance of *DUSP3* and *DUSP8* mRNA were greater ($p < 0.05$) in large compared to small antral follicles, and *DUSP22* mRNA was less abundant in large follicles compared to medium sized follicles. The remaining members were not detected in granulosa cells but mRNA was readily amplified in brain or muscle tissue (data not shown).

3.2. Regulation of DUSP mRNA and protein by FGF2

To determine the regulation of DUSPs in granulosa cells, we first assessed the effects of FGF2 on the abundance of mRNA encoding all 16 DUSP family members. Addition of FGF2 for 1.5 h caused an increase ($p < 0.05$) in *DUSP1*, *DUSP2* and *DUSP5* mRNA abundance at the three doses tested (Fig. 2); no other DUSP mRNA was altered by treatment with FGF2 (*DUSP6* shown in Fig. 2). A time-course study was then performed with 10 ng/ml FGF2, and three patterns of DUSP upregulation were observed; a rapid response in which *DUSP1* mRNA abundance were significantly increased ($p < 0.05$) after 1 h of treatment and returned to control abundance within 2 h (Fig. 3A), a medium response in which *DUSP2* and *DUSP5* mRNA abundance increased ($p < 0.05$) over the 2-4 h time period and then returned to control values, and the late response seen for *DUSP6* where mRNA abundance did not increase before 8 h (Fig. 3A). None of the other 12 DUSP mRNA were affected by FGF2 treatment (not shown).

Cell cultures were performed to measure abundance of DUSP1, DUSP5 and DUSP6 proteins. Abundance of DUSP1 increased ($p < 0.05$) transiently at 3 h post-treatment, whereas DUSP5 abundance did not change (Fig. 3B). An additional time-course experiment was performed at 8, 12 and 24 h for DUSP6, which was increased by FGF2 at each of these time points ($p < 0.05$; Fig. 3C).

3.3. Regulation of DUSP mRNA by FGF8 family members

We assessed the effects of two closely related FGFs, FGF8b and FGF18, that have different effects on MAPK3/1 phosphorylation. Addition of FGF8b had modest effects on DUSP mRNA abundance compared with FGF2, as significant ($p < 0.05$) stimulation

was observed only for *DUSP5* (Fig. 4) and none of the other 15 mRNAs measured (*DUSP1* and *DUSP6* shown in Fig. 4). Treatment with FGF18, which does not activate the MAPK3/1 pathway, did not alter the abundance of mRNA of any of the 16 DUSPs measured (not shown). To ensure that the FGF18 was biologically active, we measured abundance of *GADD45B* mRNA at 8 h of treatment, and FGF18 reduced mRNA abundance by 45% ($p < 0.05$) as has been shown in cattle (Portela et al., 2015).

3.4. Role of DUSP1 and DUSP6 in FGF2 signaling

To determine the impact of DUSPs on MAPK signaling in ovine granulosa cells, we pre-treated the cells for 1 h with commercially available inhibitors targeting DUSP1 or DUSP1/6 before FGF2 treatment. Treatment with FGF2 rapidly and transiently stimulated MAPK3/1 phosphorylation ($p < 0.05$), which was abolished by pretreatment with BCI, an inhibitor of both DUSP1 and DUSP6 (Fig. 5 A, B). Basal abundance of MAPK3/1 phosphorylation was not affected. Treatment with FGF2 did not stimulate MAPK8 or MAPK14 phosphorylation and BCI did not affect MAPK14 (Fig. 5 C). Inhibition of both DUSP1 and DUSP6 significantly increased ($p < 0.05$) basal phosphorylation of MAPK8 (Fig. 5 A, D).

Selective inhibition of DUSP1 did not impact FGF2 signaling, as no significant variation was observed between cells pre-treated and not with TPL at each time (Fig. 6). In these experiments, FGF2 stimulated MAPK3/1 phosphorylation as observed above, and also increased phosphorylation of MAPK14 but had no effect on MAPK8 phosphorylation.

4. Discussion

The activation of MAPKs by growth factors has been well explored in the ovary, but less is known about the control of intracellular negative regulators of growth factor signaling. In this study, we describe the presence of mRNA encoding 16 members of the A-DUSP/MKP subfamily in sheep granulosa cells as detected by qPCR. Eleven out of these 16 DUSPs have been reported in rat granulosa cells, specifically *Dusp1*, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 16, 18, 19 and 22 (Donaubauer et al., 2016; Herndon et al., 2016). We observed divergent variations in *DUSP3*, *DUSP8* and *DUSP22* mRNA abundance across follicle size groups from ewes in vivo, which suggests long-term (days) regulation of DUSP proteins during folliculogenesis consistent with the activation of MAPK signaling during follicle development (Bertoldo et al., 2016; Wayne et al., 2007; Yu et al., 2005).

However, cellular responses to growth factors are often quite rapid, therefore we assessed short-term regulation of DUSP family members in response to FGF2 in cell culture. Addition of FGF2 caused a rapid and transient (for less than 1 h) increase in MAPK3/1 phosphorylation as has been shown in other species including cattle (Jiang et al., 2011), and increased abundance of *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP5* and *DUSP6* mRNA and DUSP1 and DUSP6 protein abundance. These results are consistent with studies showing FGF-dependent stimulation of DUSP1, DUSP5 and DUSP6 in *Xenopus* oocytes (Branney et al., 2009), human neurons (Gupta et al., 2018) and the mouse 3T3 fibroblast line (Ekerot et al., 2008), and with increased *DUSP5* and *DUSP6* mRNA abundance after exposure to TGF α in chicken granulosa cells (Woods and Johnson, 2006). Addition of FGF2 did not alter *DUSP3*, *DUSP8* or *DUSP22* mRNA abundance, which suggests that the changes observed in follicles in vivo are in response to ligands other than FGF2.

Other FGF ligands stimulate MAPK signaling to different extents, for example unlike FGF2, FGF8b caused a sustained (for at least 2 h) increase in MAPK3/1 phosphorylation in bovine granulosa cells (Jiang et al., 2013) and other cell types (Tarkkonen et al., 2010). In bovine granulosa cells, FGF2 and FGF8b stimulated the abundance of mRNA encoding the negative feedback SPRY proteins to the same extent (Jiang et al., 2013, 2011), suggesting that they do not account for the different effects of FGF2 and FGF8b. In the present study, unlike FGF2, FGF8b had little effect on abundance of mRNA encoding DUSP proteins, which provides an explanation for the reported prolonged phosphorylation of MAPK3/1 following FGF8b treatment. This does however contrast with the reported FGF8b stimulation of *DUSP6* mRNA abundance in chick embryos (Kawakami et al., 2003) and the fetal mouse brain (Echevarria et al., 2005), which may be due to differences between species, tissue or developmental stage.

We also tested the effect of FGF18, which in bovine granulosa cells does not activate MAPK3/1 or increase SPRY mRNA abundance (Jiang et al., 2013), and consistent with these data FGF18 did not alter abundance of mRNA encoding any of the 16 DUSP proteins measured. This strongly suggests that the lack of increased MAPK3/1 phosphorylation upon FGF18 signaling is not caused by a strong intracellular negative feedback response, but rather due to a deficiency in MAPK kinase signaling.

The role DUSP proteins may play in MAPK signaling in granulosa cells is unclear. The four DUSP family members stimulated by FGF2 are known to decrease MAPK3/1 phosphorylation, and DUSP1 also targets MAPK8 and MAPK14 (Caunt and Keyse, 2013; Franklin et al., 1998; Franklin and Kraft, 1997; Jeffrey et al., 2007), therefore we treated sheep granulosa cells with triptolide, an inhibitor selective for DUSP1. This had

no effect on FGF2-stimulated MAPK3/1, MAPK8 or MAPK14 phosphorylation, which is consistent with the lack of effect of this same inhibitor on FSH-treated rat granulosa cells (Donaubauer et al., 2016). However siRNA-mediated knockdown of DUSP1 decreased MAPK3/1, MAPK8 and MAPK14 phosphorylation in bovine cumulus cells from medium and large sized follicles (Fu et al., 2019). Thus, despite the observed increase in DUSP1 mRNA and protein abundance following treatment with FGF2, this protein either plays a minor role in the regulation of the MAPKs measured, or its loss was compensated by the action of other DUSPs.

We then used the dual DUSP1/DUSP6 inhibitor BCI to explore the role of DUSP6, which resulted in a marked increase in MAPK8 phosphorylation independent of the presence of FGF2, agreeing with studies showing increased phosphoMAPK8 abundance in T cells and in nerve tumor cells treated with BCI (Franklin and Kraft, 1997; Hsu et al., 2018; Ramkissoon et al., 2019), and strongly suggesting regulation of MAPK8 signaling by DUSP6 in granulosa cells. In contrast however, this inhibitor abolished the ability of FGF2 to increase MAPK3/1 phosphorylation, and similar effects have been observed in activated T cells (Hsu et al., 2018) and lipopolysaccharide-stimulated rat microglia (Ham et al., 2015), although the effect may be cell-type specific as BCI stimulated phosphoMAPK3/1 abundance in nerve tumor cells (Ramkissoon et al., 2019). The paradoxical action of BCI on ligand-stimulated phosphoMAPK3/1 abundance has not been explained, but may be caused by compensatory overexpression of other MAPK3/1 negative feedback mechanisms or by potential non-specific effects of BCI.

In summary, we show that DUSP1, DUSP5 and DUSP6 are regulated by FGF2 in sheep granulosa cells and the consistent reports of DUSP1, DUSP5 and DUSP6

regulation across species and tissues points to a highly conserved role for these three proteins. There appears to be a minor role for DUSP1 in MAPK signaling in granulosa cells, while DUSP6 activity has a major regulatory role for MAPK8 (JNK) phosphorylation. We also propose that the longer duration of MAPK3/1 phosphorylation reportedly induced by FGF8b compared to FGF2 is related to the inability of FGF8b to increase DUSP mRNA abundance.

Funding.

This work was supported by NSERC Canada, and RL received a scholarship from Collectivité Territoriale de Martinique.

CRedit authorship contribution statement

Lauriane Relav: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft, preparation, Writing – review & editing. **Anthony Estienne:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Christopher A. Price:** Conceptualization, Writing – original draft, preparation, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Acknowledgments

We thank El Arbi Abulghasem for assistance with cell cultures, and Dr Parlow and the NHPP for providing ovine FSH.

References

- Assidi, M., Dieleman, S.J., Sirard, M.-A., 2010. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction* 140, 835–852. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0248>
- Baird, A., Hsueh, A.J.W., 1986. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regulatory Peptides* 16, 243–250. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(86\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0167-0115(86)90023-6)
- Bertoldo, M.J., Bernard, J., Duffard, N., Tsikis, G., Alves, S., Calais, L., Uzbekova, S., Monniaux, D., Mermillod, P., Locatelli, Y., 2016. Inhibitors of c-Jun phosphorylation impede ovine primordial follicle activation. *Molecular Human Reproduction* 22, 338–349. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw012>
- Branney, P.A., Faas, L., Steane, S.E., Pownall, M.E., Isaacs, H.V., 2009. Characterisation of the Fibroblast Growth Factor Dependent Transcriptome in Early Development. *PLoS ONE* 4, e4951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004951>
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., Webb, R., 1996. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J. Reprod. Fertil.* 106, 7–16.
- Camps, M., Nichols, A., Arkinstall, S., 2000. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J* 14, 6–16.
- Caunt, C.J., Keyse, S.M., 2013. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS Journal* 280, 489–504. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x>

Chaves, R.N., Tavares de Matos, M.H., Buratini, J., Ricardo de Figueiredo, J., 2012. The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 905. <https://doi.org/10.1071/RD11318>

Cheng, J.-C., Fang, L., Chang, H.-M., Sun, Y.-P., Leung, P.C.K., 2016. hCG-induced Sprouty2 mediates amphiregulin-stimulated COX-2/PGE2 up-regulation in human granulosa cells: a potential mechanism for the OHSS. *Scientific Reports* 6, 31675. <https://doi.org/10.1038/srep31675>

Donaubauer, E.M., Law, N.C., Hunzicker-Dunn, M.E., 2016. Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-dependent Regulation of Extracellular Regulated Kinase (ERK) Phosphorylation by the Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase MKP3. *J. Biol. Chem.* 291, 19701–19712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.733972>

Drouilhet, L., Mansanet, C., Sarry, J., Tabet, K., Bardou, P., Woloszyn, F., Lluch, J., Harichaux, G., Viguié, C., Monniaux, D., Bodin, L., Mulsant, P., Fabre, S., 2013. The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the B4GALNT2 gene within the ovary. *PLoS Genet* 9, e1003809. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003809>

Echevarria, D., Martinez, S., Marques, S., Lucas-Teixeira, V., Belo, J.A., 2005. Mkp3 is a negative feedback modulator of Fgf8 signaling in the mammalian isthmic organizer. *Developmental Biology* 277, 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.09.011>

Ekerot, M., Stavridis, M.P., Delavaine, L., Mitchell, M.P., Staples, C., Owens, D.M., Keenan, I.D., Dickinson, R.J., Storey, K.G., Keyse, S.M., 2008. Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by

Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem J* 412, 287–298. <https://doi.org/10.1042/BJ20071512>

Estienne, A., Pierre, A., di Clemente, N., Picard, J.-Y., Jarrier, P., Mansanet, C., Monniaux, D., Fabre, S., 2015. Anti-Müllerian hormone regulation by the bone morphogenetic proteins in the sheep ovary: deciphering a direct regulatory pathway. *Endocrinology* 156, 301–313. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1551>

Franklin, C.C., Kraft, A.S., 1997. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem* 272, 16917–16923. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.16917>

Franklin, C.C., Srikanth, S., Kraft, A.S., 1998. Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3014–3019.

Fu, X., Chen, C., Li, S., Han, D., Wang, Y., Yuan, B., Gao, Y., Zhang, J., Jiang, H., 2019. Dual-specificity phosphatase 1 regulates cell cycle progression and apoptosis in cumulus cells by affecting mitochondrial function, oxidative stress, and autophagy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 317, C1183–C1193. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00012.2019>

Gospodarowicz, D., Bialecki, H., 1979. Fibroblast and Epidermal Growth Factors are Mitogenic Agents for Cultured Granulosa Cells of Rodent, Porcine, and Human Origin*. *Endocrinology* 104, 757–764. <https://doi.org/10.1210/endo-104-3-757>

Gupta, S., M-Redmond, T., Meng, F., Tidball, A., Akil, H., Watson, S., Parent, J.M., Uhler, M., 2018. Fibroblast growth factor 2 regulates activity and gene expression of

human post-mitotic excitatory neurons. *J. Neurochem.* 145, 188–203.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14255>

Ham, J.-E., Oh, E.-K., Kim, D.-H., Choi, S.-H., 2015. Differential expression profiles and roles of inducible DUSPs and ERK1/2-specific constitutive DUSP6 and DUSP7 in microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467, 254–260.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.180>

Herndon, M.K., Law, N.C., Donaubaauer, E.M., Kyriss, B., Hunzicker-Dunn, M., 2016. Forkhead box O member FOXO1 regulates the majority of follicle-stimulating hormone responsive genes in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 434, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.020>

Hsu, W.-C., Chen, M.-Y., Hsu, S.-C., Huang, L.-R., Kao, C.-Y., Cheng, W.-H., Pan, C.-H., Wu, M.-S., Yu, G.-Y., Hung, M.-S., Leu, C.-M., Tan, T.-H., Su, Y.-W., 2018. DUSP6 mediates T cell receptor-engaged glycolysis and restrains TFH cell differentiation. *PNAS* 115, E8027–E8036. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800076115>

Huang, C.-Y., Tan, T.-H., 2012. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & Bioscience* 2, 24. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-24>

Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., Mackay, C.R., 2007. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 6, 391–403. <https://doi.org/10.1038/nrd2289>

Jiang, Z., Guerrero-Netro, H.M., Juengel, J.L., Price, C.A., 2013. Divergence of intracellular signaling pathways and early response genes of two closely related fibroblast growth factors, FGF8 and FGF18, in bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 375, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.017>

- Jiang, Z.L., Price, C.A., 2012. Differential actions of fibroblast growth factors on intracellular pathways and target gene expression in bovine ovarian granulosa cells. *Reproduction* 144, 625–632. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0199>
- Jiang, Z.L., Ripamonte, P., Buratini, J., Portela, V.M., Price, C.A., 2011. Fibroblast growth factor-2 regulation of Sprouty and NR4A genes in bovine ovarian granulosa cells. *J. Cell. Physiol.* 226, 1820–1827. <https://doi.org/10.1002/jcp.22509>
- Kawakami, Y., Rodríguez-León, J., Koth, C.M., Büscher, D., Itoh, T., Raya, Á., Ng, J.K., Esteban, C.R., Takahashi, S., Henrique, D., Schwarz, M.-F., Asahara, H., Izpisua Belmonte, J.C., 2003. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol* 5, 513–519. <https://doi.org/10.1038/ncb989>
- Khan, D.R., Guillemette, C., Sirard, M.A., Richard, F.J., 2015a. Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence acquisition. *Mol. Hum. Reprod.* 21, 688–701. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav032>
- Khan, D.R., Guillemette, C., Sirard, M.A., Richard, F.J., 2015b. Transcriptomic analysis of cyclic AMP response in bovine cumulus cells. *Physiol Genomics* 47, 432–442. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00043.2015>
- Koo, H.S., Kang, S.D., Lee, J.H., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Pae, H.-O., 2009. Triptolide Inhibits the Proliferation of Immortalized HT22 Hippocampal Cells Via Persistent Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 by Down-Regulating Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Expression. *J Korean Neurosurg Soc* 46, 389–396. <https://doi.org/10.3340/jkns.2009.46.4.389>

Lake, D., Corrêa, S.A.L., Müller, J., 2016. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4397–4413. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2297-8>

Marshall, C.J., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179–185. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8)

Miyoshi, T., Otsuka, F., Yamashita, M., Inagaki, K., Nakamura, E., Tsukamoto, N., Takeda, M., Suzuki, J., Makino, H., 2010. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 325, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.012>

Molina, G., Vogt, A., Bakan, A., Dai, W., de Oliveira, P.Q., Znosko, W., Smithgall, T.E., Bahar, I., Lazo, J.S., Day, B.W., Tsang, M., 2009. Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. *Nature Chemical Biology* 5, 680–687. <https://doi.org/10.1038/nchembio.190>

Monniaux, D., Genêt, C., Maillard, V., Jarrier, P., Adriaensen, H., Hennequet-Antier, C., Lainé, A.-L., Laclie, C., Papillier, P., Plisson-Petit, F., Estienne, A., Cognié, J., di Clemente, N., Dalbès-Tran, R., Fabre, S., 2020. Prenatal programming by testosterone of follicular theca cell functions in ovary. *Cell Mol Life Sci* 77, 1177–1196. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03230-1>

Needleman, S.B., Wunsch, C.D., 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48, 443–453. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90057-4)

- Ornitz, D.M., Itoh, N., 2015. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Dev Biol* 4, 215–266. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>
- Patterson, K.I., Brummer, T., O'brien, P.M., Daly, R.J., 2009. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochemical Journal* 418, 475–489. <https://doi.org/10.1042/BJ20082234>
- Peluso, J.J., Pappalardo, A., Fernandez, G., 2001. Basic Fibroblast Growth Factor Maintains Calcium Homeostasis and Granulosa Cell Viability by Stimulating Calcium Efflux via a PKC δ -Dependent Pathway. *Endocrinology* 142, 4203–4211. <https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8460>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pierre, A., Estienne, A., Racine, C., Picard, J.-Y., Fanchin, R., Lahoz, B., Alabart, J.L., Folch, J., Jarrier, P., Fabre, S., Monniaux, D., di Clemente, N., 2016. The Bone Morphogenetic Protein 15 Up-Regulates the Anti-Müllerian Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 2602–2611. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-4066>
- Portela, V.M., Dirandeh, E., Guerrero-Netro, H.M., Zamberlam, G., Barreta, M.H., Goetten, A.F., Price, C.A., 2015. The Role of Fibroblast Growth Factor-18 in Follicular Atresia in Cattle. *Biol Reprod* 92, 14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121376>
- Price, C.A., 2016. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *J. Endocrinol.* 228, R31-43. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0414>
- Ramkissoon, A., Chaney, K.E., Milewski, D., Williams, K.B., Williams, R.L., Choi, K., Miller, A., Kalin, T.V., Pressey, J.G., Szabo, S., Azam, M., Largaespada, D.A., Ratner,

N., 2019. Targeted Inhibition of the Dual Specificity Phosphatases DUSP1 and DUSP6 Suppress MPNST Growth via JNK. *Clin Cancer Res* 25, 4117–4127. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3224>

Sugiura, K., Su, Y.-Q., Li, Q., Wigglesworth, K., Matzuk, M.M., Eppig, J.J., 2009. Fibroblast Growth Factors and Epidermal Growth Factor Cooperate with Oocyte-Derived Members of the TGFbeta Superfamily to Regulate Spry2 mRNA Levels in Mouse Cumulus Cells. *Biology of Reproduction* 81, 833–841. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078485>

Tarkkonen, K., Ruohola, J., Härkönen, P., 2010. Fibroblast growth factor 8 induced downregulation of thrombospondin 1 is mediated by the MEK/ERK and PI3K pathways in breast cancer cells. *Growth Factors* 28, 256–267. <https://doi.org/10.3109/08977191003745480>

Tilly, J.L., 1992. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Molecular Endocrinology* 6, 1942–1950. <https://doi.org/10.1210/me.6.11.1942>

Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C.J., Cohen, P., Ullrich, A., 1994. EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Current Biology* 4, 694–701. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00154-8)

Wayne, C.M., Fan, H.-Y., Cheng, X., Richards, J.S., 2007. Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol* 21, 1940–1957. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0020>

Woods, D.C., Johnson, A.L., 2006. Phosphatase Activation by Epidermal Growth Factor Family Ligands Regulates Extracellular Regulated Kinase Signaling in Undifferentiated Hen Granulosa Cells. *Endocrinology* 147, 4931–4940. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0194>

Yu, F.-Q., Han, C.-S., Yang, W., Jin, X., Hu, Z.-Y., Liu, Y.-X., 2005. Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *J Endocrinol* 186, 85–96. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05955>

Tables and figures

Table 1. – Forward (F) and reverse (R) primers used in RT-qPCR

Gene	Sequence 5' → 3'	Accession number
DUSP1	F: ACCATTTTCGAGGGTCACTACCA R: AGCTTGACTCGGTTAGTCCTCA	XM_004016868.3
DUSP2	F: CTCCAGGGCTCCCTCTTACG R: CCTCAAAGTGGTTGGGGCAG	XM_015093902.1
DUSP3	F: CGTTCGAGCTCTCCGTGC R: GCTTGGGGATGTCTTGAGCC	XM_015098810.1
DUSP4	F: GGACAGCACCGTGTGCG R: CAGAGCCTTGGTCTTGGAACAG	XM_004021751.2
DUSP5	F: AGGGGGATATGAGACTTTCTACTCG R: GCACTGACTTCCACACTGAC	XM_015103278.1
DUSP6	F: CCCCCAACTTGCCGAATCTC R: GGCTGATGCCAGCTAAGCAA	XM_004006243.3
DUSP7	F: GGGCGAGTTCACCTACAAGC R: GACAAAGTCGTAGGCGTCGTT	XM_015102143.1
DUSP8	F: TCACCTCTACCTGGGCTCTC R: GTTGTCATTGATGGGAATGCG	XM_012102409.2
DUSP9	F: GAAGCCGACTCGGTGCTG R: TCGAGGCTGGTCTCACAGAG	XM_012107802.2
DUSP10	F: GAATGAGGGCTGAATGTGCGA R: TGTCGTCTAAAGGAGACGGAGG	XM_004013609.3
DUSP11	F: ACTACCTCCAGTTGGACAGAG R: GGAAAAACATTCTTCTGGGGCAAG	XM_004006079.3
DUSP12	F: TTTGCCACAAGAGGATGACAG R: GGAGCACTGTTCCACCATACCAG	XM_004002704.3
DUSP13	F: TTCTGCAGCTGACTTCATCCA R: CTCTGTTGGGGAAGACCCATC	XM_004021499.3
DUSP14	F: TTTCCAGACCCAGGACTCCA R: ACTTGCATCGTTGGGAGCAA	XM_004012438.3
DUSP15	F: AGACACAGATCAGCTAGGCCG R: TTGATGGGTACCTCAGGGGC	XM_015099489.1
DUSP16	F: TGTAGGGAGTGCATTGTTGCC R: GTTACCTGGTTGGTGC GTGT	XM_015094926.1
DUSP18	F: GACCGATCTTCTCTTACCCGGA R: TTCCTGCTAGGCTGTGTCCAT	XM_027956778.1

DUSP19	F: ATTAAGCCATGGTTGCTCCTGG R: TGAGGAAAGCGTTTTCAACTCCA	XM_004004524.3
DUSP21	F: GGGTTACCAGCATACTGTCGC R: ATTCGAAACGGACACAGAGGC	XM_015104757.1
DUSP22	F: CCCTGGTGGTCGCCTATATC R: CAGTGCAGTTACCTGGTGGGA	XM_012101407.2
DUSP23	F: AGGCGATACTGCCTGGTAGG R: ACACCAGATGCCGTACACCT	XM_004002652.3
DUSP26	F: TAACCATGCCGACGAGGTCT R: CCCGGTGGTTGTTGGCTATT	XM_015104598.1
DUSP27	F: GCAGAAGTGAAGTGAGCAGCA R: TTGGACCTCCCGTTTATGGCT	XM_004003734.3
RPL19	F: TATGGGTATAGGTAAGCGAAAG R: TGGCGGTCAATCTTCTTAG	XM_004012837
SDHA	F: GAATGGTCTGGAACACTGA R: AGTAATCGTACTCGTCAACC	XM_012125144
YWHAZ	F: ACCAACACATCCTATCAGAC R: CTCTCAGTAACTGCATTATTAGC	XM_027980212.1

Table 2. – Antibodies used in Western Blot.

Name of Antibody	Manufacturer (cat. no.)	Type	Dilution
β -actin (C4)	Santa Cruz (sc-47778 HRP)	CkM	1/5000 ^{3,a}
DUSP6 (F-12)	Santa Cruz (sc-377070)	MsM	1/2000 ^{3,c}
DUSP1	Biorbyt (orb317657)	RbP	1/200 ^{2,a}
DUSP5 (H-9)	Santa-Cruz (sc-393801)	MsM	1/200 ^{2,a}
Phospho-MAPK3/1 (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	Cell signaling (4370)	RbM	1/2000 ^{3,a}
Total MAPK3/1	Cell signaling (9102)	RbP	1/2000 ^{3,a}
Phospho-MAPK8 (Thr183/Tyr185) (81E11)	Cell signaling (4668)	RbM	1/1000 ^{1,a}
MAPK8	Cell signaling (9252)	RbP	1/1000 ^{2,a}
Phospho-MAPK14 (Thr180/Tyr182) (3D7)	Cell signaling (9215)	RbM	1/1000 ^{2,c}
Total MAPK14	Cell signaling (9212)	RbP	1/1000 ^{2,c}
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked	GE Healthcare (NA934V)	Dy	1/10000 ^c
Anti-Mouse IgG, HRP conjugated	Calbiochem (402334)	Rb	1/20000 ^c

CkM: Chicken monoclonal; MsM: mouse monoclonal; RbP: rabbit polyclonal; RbM: rabbit monoclonal; Dy: donkey; Rb: rabbit. Superscript numbers stand for blocking buffers and letters for buffers used to dilute antibodies. 1 and a: TTBS; 2 and b: 5% BSA in TTBS; 3 and c: 5% milk in TTBS.

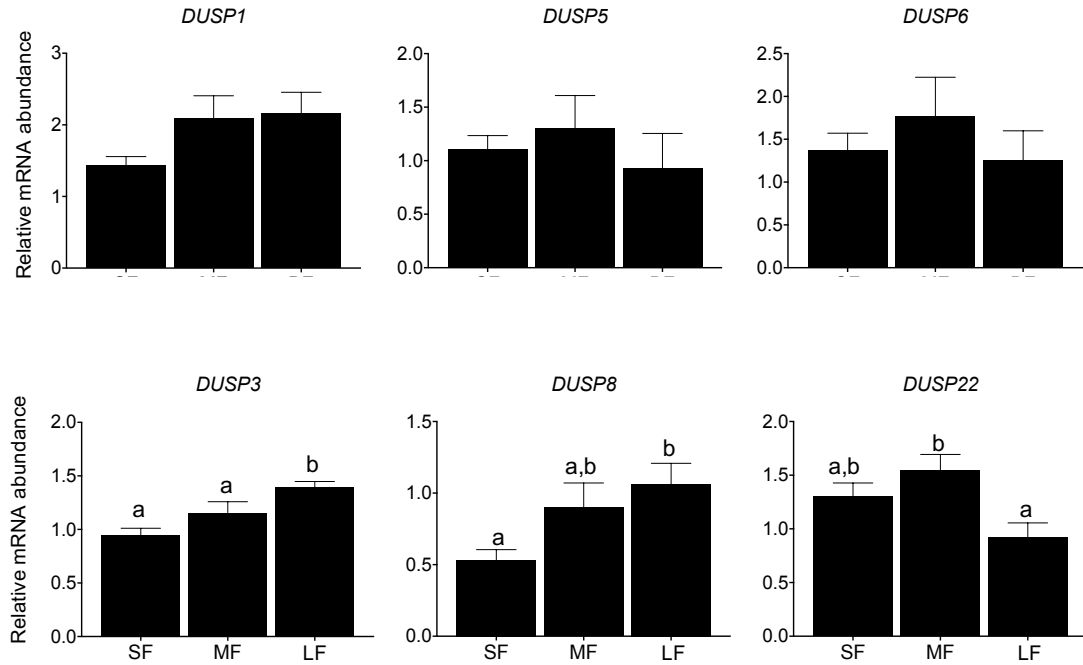


Fig. 1. Profile of abundance of mRNA encoding DUSP family members according to follicle size. Ovaries from 8 ewes were collected at an abattoir and small (SF, 1–3 mm diameter), medium (MF, 3–5 mm) and large antral follicles (LF, greater than 5 mm) were isolated. Granulosa cells were pooled within follicle size for each ewe, and mRNA abundance measured by qPCR. Graphs illustrate three DUSP members that differed with follicle size and three that did not. Different letters above bars indicate significant differences ($p < 0.05$, Fisher's LSD test).

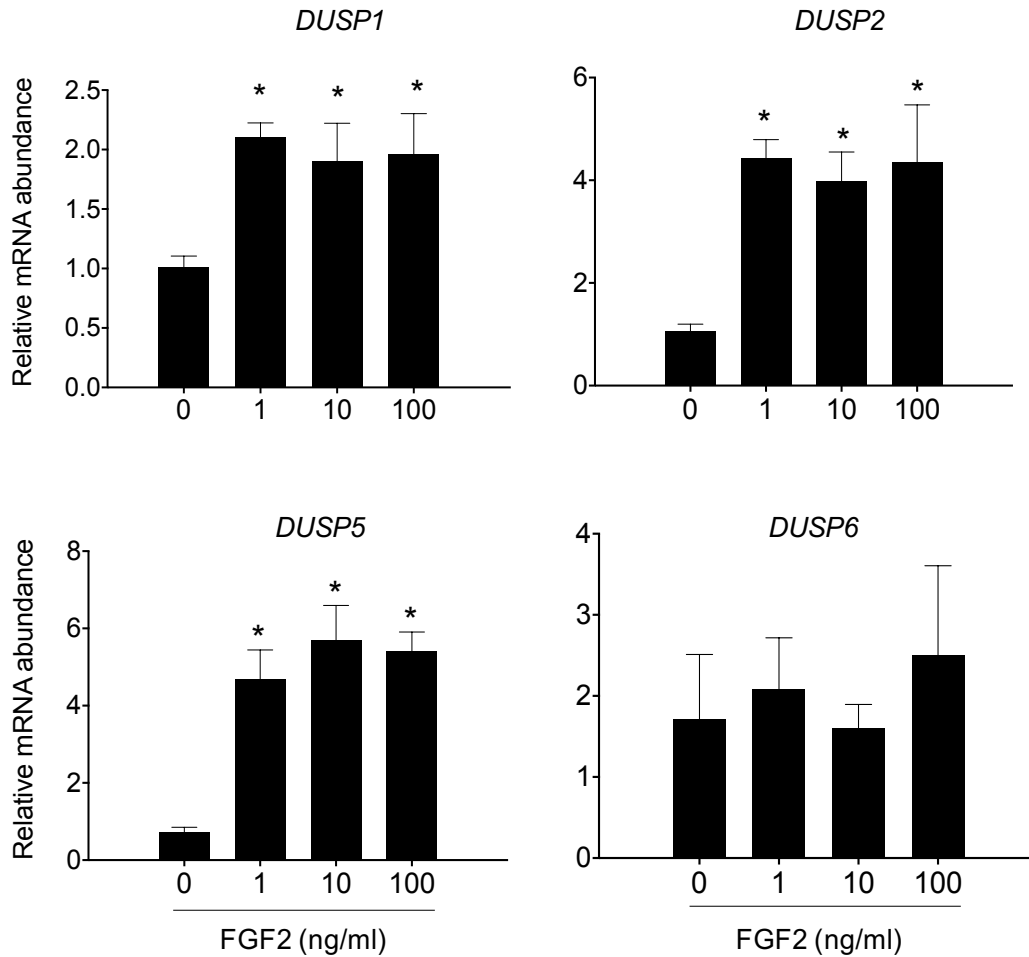


Fig. 2. FGF2 increased abundance of DUSP mRNA. Ovine granulosa cells were harvested from 1 to 4 mm antral follicles and cultured under serum-free conditions. On day 5 of culture, the cells were stimulated for 1.5 h with 0, 1, 10 or 100 ng/ml in duplicate wells. Total RNA was extracted for measurement of mRNA abundance by qPCR. Data are expressed as means and SEM of 5 independent cell cultures. Asterisks denote means that are statistically different from controls ($p < 0.05$, Fisher's LSD test).

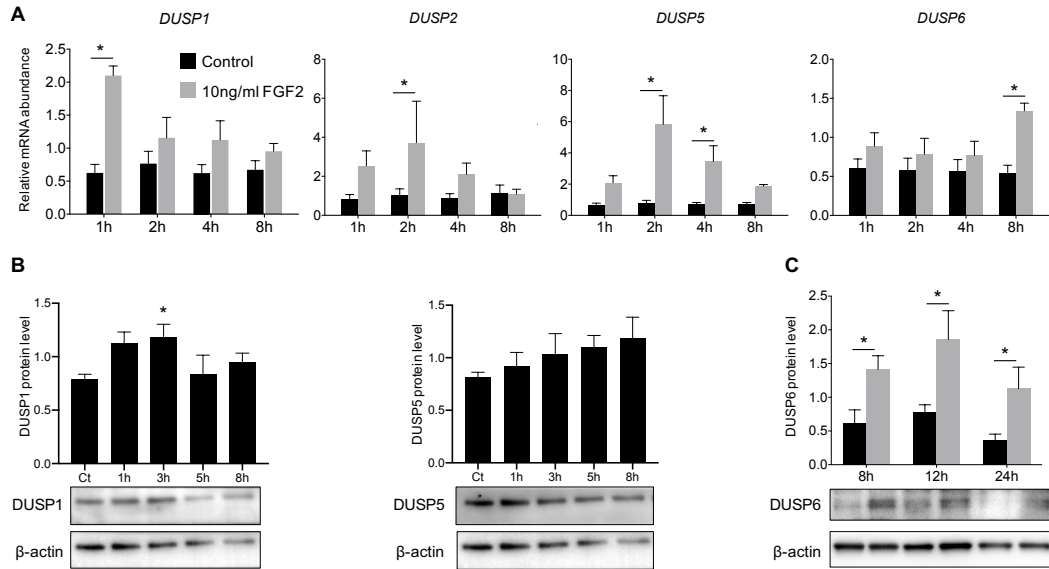


Fig. 3. Effect of FGF2 on DUSP mRNA and protein abundance. Ovine granulosa cells were harvested from 1 to 4 mm antral follicles and cultured under serum-free conditions. On day 5 of culture, cells were treated with or without 10 ng/ml FGF2 for the times stated, and RNA extracted for qPCR or total cell proteins extracted for immunoblotting. (A) Relative abundance of mRNA encoding DUSP1, DUSP2, DUSP5 and DUSP6. Abundance of DUSP1, DUSP5 (B) DUSP6 (C) proteins were measured by Western blot, and representative blots are shown. Data are presented as means + SEM of 5 independent cell cultures. Asterisks indicate significant differences between FGF2 and control treatments ($p < 0.05$, Fisher's LSD test).

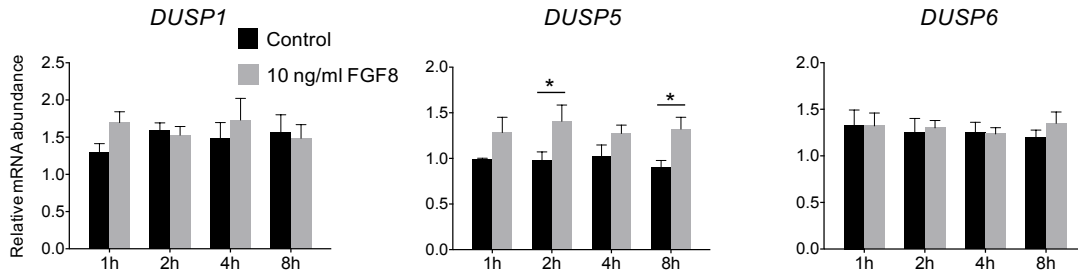


Fig. 4. Effect of FGF8 on abundance of mRNA encoding DUSPs. Ovine granulosa cells were harvested from 1 to 4 mm antral follicles and cultured under serum-free conditions. On day 5 of culture, cells were treated with or without 10 ng/ml FGF8b for the times shown. Total RNA was extracted for measurement of mRNA abundance by qPCR. The graphs represent means + SEM of 5 independent cell cultures, and asterisks indicate significant differences between FGF8b and control treatments ($p < 0.05$, Fisher's LSD test).

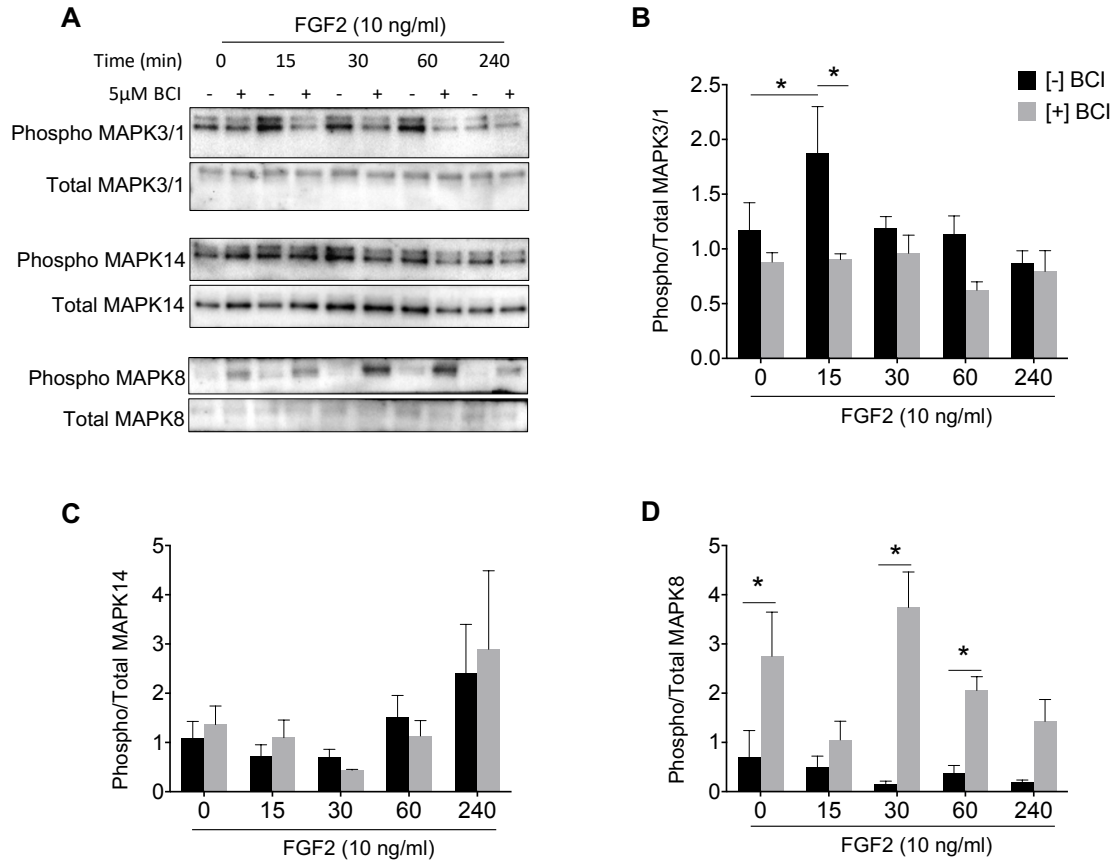


Fig. 5. Effects of DUSP1/6 inhibition on MAPK phosphorylation. Ovine granulosa cells cultured for 5 days in serum-free medium were pre-treated with the 5 μ M BCI or vehicle (DMSO) for 1 h, then challenged with 10 ng/ml FGF2 for the indicated times, and total cell protein was extracted for immunoblotting. (A) Representative immunoblots for the phospho- and total target protein pairs, and mean ratios of (B) phospho-MAPK3/1, (C) phospho-MAPK14 and (D) phospho-MAPK8 abundance relative to their corresponding total protein. The graphs represent means + SEM of 5 independent cell cultures. Asterisks show significant differences between FGF treated groups compared to $t = 0$ min ($p < 0.05$, Fisher's LSD) or BCI treated compared to BCI non-treated groups at each time point ($p < 0.05$, t -test).

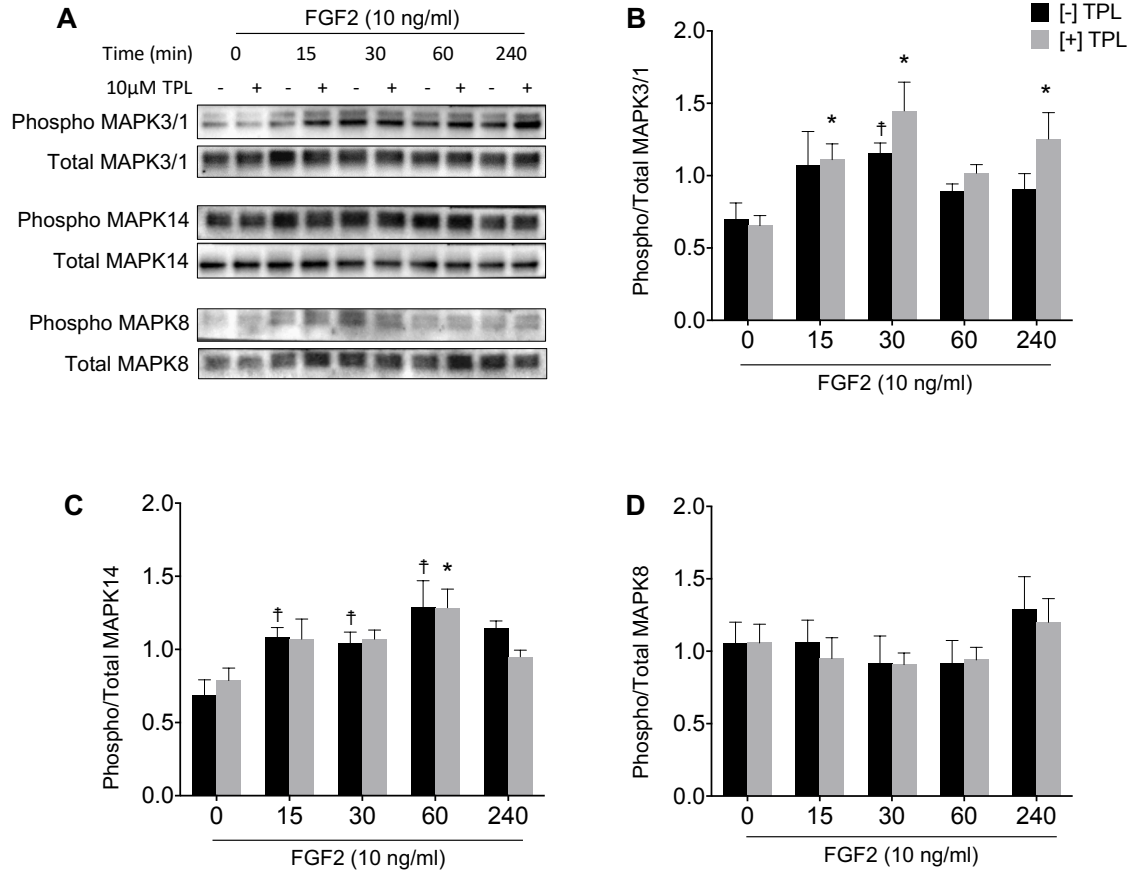


Fig. 6. Effects of inhibition of DUSP1 on MAPK phosphorylation. Ovine granulosa cells cultured for 5 days in serum-free medium were pre-treated with the 10 μ M triptolide (TPL) or vehicle (DMSO) for 1 h, then challenged with 10 ng/ml FGF2 for the indicated times, and total cell protein was extracted for immunoblotting. (A) Representative immunoblots for the phospho- and total target protein pairs, and mean ratios of (B) phospho-MAPK3/1, (C) phospho-MAPK14 and (D) phospho-MAPK8 abundance relative to their corresponding total protein. The graphs represent means + SEM of 5 independent cell cultures. Significant differences between FGF treated groups and time 0 controls are shown for cells with (asterisk) or without (dagger) DUSP1 inhibitor ($p < 0.05$, Fisher's LSD).

Chapitre 4 – Article 2

Contribution des auteurs

Lauriane Relav

Collecte et dissection des ovaires

Entretien des cultures cellulaires

Exécution des méthodes biochimiques

Analyse des données

Rédaction de la version originale du manuscrit

Révisions et édition du manuscrit

Christopher A. Price

Conceptualisation et supervision de l'étude

Analyse des données

Rédaction de la version originale du manuscrit

Révisions et édition du manuscrit

Acquisition de fonds

Regulation of Dual Specificity Phosphatases by Fibroblast Growth Factor signaling pathways in bovine granulosa cells

Lauriane Relav^{1,2}, Christopher A. Price¹

¹ Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, J2S 7C6 QC Canada.

² Current address: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

Correspondence should be addressed to CA Price: christopher.price@umontreal.ca

Key words: follicle, granulosa, MAPK, DUSP, calcium, ovary, cattle

Short title: Calcium and DUSP6 expression

Word count: 3038

Article publié

Relav, L., & Price, C. A. (2021). Regulation of dual specificity phosphatases by fibroblast growth factor signaling pathways in bovine granulosa cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, 162(5), 367-374. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0270>

Abstract

Controlling the duration and amplitude of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling is an important element in deciding cell fate. One group of intracellular negative regulators of MAPK activity is a subfamily of the dual specificity phosphatase (DUSP) superfamily, of which up to 16 members have been described in the ovarian granulosa cells. Growth factors stimulate proliferation of granulosa cells through MAPK, protein kinase C (PKC), and AKT pathways, although it is not known which pathways control DUSP expression in these cells. The aim of the present study was to identify which pathways were involved in the regulation of DUSP expression using a well-established serum-free culture system for bovine granulosa cells. Stimulation of cells with FGF2 increased *DUSP1*, *DUSP5*, and *DUSP6* mRNA abundance in a time- and dose-dependent manner, and increased DUSP5 and DUSP6 protein accumulation. None of the other eleven DUSP measured were regulated by FGF2. Pharmacological inhibition of MAPK3/1 signaling decreased FGF2-stimulated *DUSP1*, *DUSP5*, and *DUSP6* mRNA levels ($P < 0.05$), whereas inhibition of PKC did not affect the expression of these three DUSPs. Abundance of FGF2-dependent DUSP6 mRNA was reduced by inhibition of phospholipase C (PLC) or by chelating calcium, but DUSP5 mRNA abundance was not affected. Abundance of basal *DUSP1* and *DUSP6*, but not *DUSP5* mRNA was increased by the addition of the calcium ionophore A23187. We conclude that FGF2 stimulation of *DUSP5* abundance requires MAPK3/1 whereas *DUSP6* mRNA accumulation is dependent on calcium signaling as well as MAPK3/1 activation, suggesting complex regulation of physiologically important DUSPs in the follicle.

Introduction

Optimal fertility depends on the health of growing ovarian follicles, which is determined largely by the health of granulosa cells (Yang & Rajamahendran 2000, Irving-Rodgers *et al.* 2001). Many locally produced growth factors direct granulosa cell fate, including members of the fibroblast growth factor (FGF) and transforming growth factor- β (TGF β) families (Chaves *et al.* 2012, Matsuda *et al.* 2012), and while many of these stimulate proliferation, others such as FGF18 and anti-Mullerian hormone are proapoptotic (Price & Estienne 2018). One well-known regulator of folliculogenesis that promotes granulosa cell proliferation is FGF2, which acts principally through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, although protein kinase C (PKC), and AKT pathways are also activated (Peluso *et al.* 2001, Miyoshi *et al.* 2010, Jiang *et al.* 2011).

The MAPK pathway is generally mitotic but can stimulate apoptosis. Signaling consists of a phosphorylation cascade in which multiple MAPK kinases result in the phosphorylation of MAPK3/1 (ERK1/2), MAPK14 (p38), or MAPK8 (c-jun N-terminal kinase, JNK). A rapid and transient increase in MAPK3/1 phosphorylation is mitogenic whereas a sustained increase leads to apoptosis (Marshall 1995, Ebisuya *et al.* 2005). Both MAPK14 and MAPK8 have been reported to increase apoptosis, most notably in cancer cells (Gilmore *et al.* 2003) but also in normal ovarian cells; for example, inhibition of MAPK8 decreased apoptosis in pig (Liu *et al.* 2019, 2020) and mouse granulosa cells (Weng *et al.* 2016), and in the KGN human granulosa cell line (Huang *et al.* 2021).

The duration and amplitude of MAPK activity is regulated by intracellular negative feedback loops involving primarily the Sprouty (SPRY) and dual specificity

phosphatase (DUSP) families of proteins. Regulation of *SPRY1*, *SPRY2*, and *SPRY4* mRNA abundance by FGFs has been demonstrated in bovine granulosa cells (Jiang *et al.* 2011, 2013, Han *et al.* 2017), and SPRY proteins have a large spectrum of action downstream of the growth factor receptor and upstream of MAPK activation (Mason *et al.* 2006, Cabrita & Christofori 2008). Many members of the DUSP family are expressed in the ovary, although few appear to be under hormone or growth factor control; abundance of DUSP1, DUSP5, and DUSP6 is stimulated by FSH or growth factors in bovine, sheep, and hen cumulus/granulosa cells (Woods & Johnson 2006, Sen *et al.* 2008, Khan *et al.* 2015, Relav *et al.* 2021), whereas these three DUSPs were inhibited by FSH in rats (Donaubauer *et al.* 2016, Herndon *et al.* 2016).

The action of DUSPs is the direct control of MAPK phosphorylation (Camps *et al.* 2000), and studies in a variety of cell types show that DUSP1, DUSP5, and DUSP6 dephosphorylate MAPK3/1, MAPK8, and MAPK14 to different extents (Patterson *et al.* 2009, Kidger & Keyse 2016), and DUSP6 appears to target pro-apoptotic MAPK8 in sheep granulosa cells (Relav *et al.* 2021). This suggests that modification of the activity of specific DUSPs may alter cell fate, therefore understanding the mechanisms regulating DUSP expression may lead to strategies to improve ovarian function.

As growth factors activate several intracellular pathways in granulosa cells, we hypothesized that the abundance of specific DUSP mRNA/proteins is controlled by distinct mechanisms to allow preferential dephosphorylation of MAPK targets. The specific aims of this study were to determine if FGF2 regulates DUSP protein and/or mRNA in bovine granulosa cells, and to identify which intracellular pathways were involved in controlling DUSP mRNA abundance in response to FGF2.

Materials and methods

Cell culture

Bovine granulosa cells were cultured in well-established serum-free conditions that promoted estradiol secretion in response to physiological concentrations of FSH (Gutiérrez *et al.* 1997, Silva & Price 2000). All the reagents were from Invitrogen (Gibco) except where specified. Bovine ovaries were collected from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in an insulated container. They were washed in 70% ethanol, rinsed with saline solution at 37°C and maintained in warm saline solution supplemented with penicillin/streptomycin until dissection of small antral follicles (2–5 mm). Follicles were placed in DMEM:F12 until granulosa cells were released by bisecting follicles in DMEM:F12 and filtered through a 150 mesh filter to remove cumulus–oocyte complexes (Sigma-Aldrich). The cell suspension was centrifuged at 980 g for 15 min, and the pellet was resuspended in culture medium composed of minimum essential medium (MEM) supplemented with 10 mmol/L sodium bicarbonate, 0.1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich), 4 ng/mL sodium selenite, 2.5 µg/mL apotransferrin, 1 µg/mL fungizone, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1.1 mmol/L nonessential amino acid solution, 10–6 M androstenedione, 25 mM HEPES, 10 ng/mL insulin, and 10 ng/mL ovine FSH (starting 2 days after the culture was started; AFP5346D; National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA, USA). Cells were plated at a density of 1×10^6 /mL/well in a 24-well plate (Corning Costar Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) and kept at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Every 48 h, 70% of the spent culture medium was renewed.

Experimental design

All treatments were applied on day 5 of culture. To assess the activation of the MAPK3/1 pathway, the cells were stimulated with 10 ng/mL recombinant human FGF2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA; more than 97% similarity with bovine FGF2, NP_776481) for 0, 15, 30, 60, and 240 min and total cell protein was harvested for Western blotting. The ability of FGF2 to regulate abundance of mRNA encoding DUSPs was assessed in dose–response and time–course studies; cells were stimulated with 0, 1, 10, or 50 ng/mL FGF2 for 2 h, or treated with FGF2 at 10 ng/mL for 0, 1, 2, 4, or 8 h. To measure the effect of FGF2 on DUSP protein abundance, cells were stimulated with 10 ng/mL FGF2 for 4, 6, 12, and 24 h. These doses and time periods were based on our previous study with FGF2 in sheep granulosa cells (Relav *et al.* 2021).

To identify the major signaling pathways involved in the regulation of abundance of mRNA of those DUSPs regulated by FGF2, cells were pretreated for 1 h with commercially available inhibitors of ERK1/2 (PD98059, abbreviated PD, 50 μ M), PLC γ (U73122, abbreviated U73, 5 μ M), PKC (GF109203X, abbreviated GF, 3 μ M, Sigma–Aldrich), and PI3K (LY294002, abbreviated LY, 20 μ M) before stimulation with 10 ng/mL FGF2 for 2 h. To assess the role of calcium signaling, cells were pretreated with the calcium chelator BAPTA-AM (1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N0,N0-tetraacetic acid tetrakis-(acetoxymethyl) ester, abbreviated BA, 10 μ M) before stimulation with FGF2 for 2 h, and cells were treated with calcium ionophore (A23187 abbreviated A23, 10 μ M) for 2 h in the absence of FGF2. All chemicals were dissolved in DMSO and further diluted in culture medium for treatments. At the end of culture, cells were harvested for RNA extraction.

Total RNA extraction and real-time qPCR

The treatments were stopped by discarding the culture medium and total RNA extraction was performed with Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration and purity was assayed using a Nanodrop 1000. An amount of 400 ng of RNA was treated with 1U DNase I, then reverse transcribed into cDNA using Omniscript RT kit (Qiagen). Briefly, DNase-treated total RNA was part of a reaction comprising 0.5 mM/dNTP, 1 μ M oligodT primer (Invitrogen), 10 U RNase inhibitor (Invitrogen), 4 U Omniscript reverse transcriptase in a total volume of 20 μ L, heated at 37°C for 1 h.

Quantitative PCR (qPCR) was performed on a CFX96 Touch thermocycler (Bio-rad) using 1 \times Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad) and 375 nM of each specific forward and reverse primer in a total reaction volume of 20 μ L. Primers were designed to amplify 14 DUSP mRNA previously detected in sheep (Relav *et al.* 2021), and sequences are presented in Table 1. Common thermocycling conditions were used: 95°C for 3 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 61°C for 30 s and 72°C for 30 s. Conditions for optimal amplification efficiency were determined with preliminary sample dilution curves. In each run, melting curve analysis was used to verify that a single product was amplified. Each reaction was performed in duplicate and the average threshold cycle (Ct) value was used to calculate relative mRNA abundance of target genes relative to the geometric mean of three housekeeping genes (*RPL19*, *SDHA*, and *YWHAZ*) with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and correction for amplification efficiency (Pfaffl 2001).

Western blotting

After treatments, the culture medium was replaced with RIPA buffer (1× phosphate buffered saline pH 7.4, 1% (v/v) NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% (v/v) SDS, and proteases and phosphatases inhibitor cocktails), and the lysate was centrifuged at 13,000 g for 10 min, to recover the supernatant used for the following steps. Protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay following the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Total proteins (20 µg) were resolved in 12% SDS-PAGE using a Tetra cell apparatus (Bio-rad). Proteins were then transferred to a LF-PVDF membrane in a semi-dry transfer system (TransBlot; Bio-rad) and cut to horizontal strips corresponding to the size of target proteins. The membranes were blocked in TTBS containing 5% (w/v) skim milk and incubated with anti-DUSP6 (1/1000 in TTBS, sc-377070 Santa Cruz) or β -actin (1/10,000 in TTBS; sc-47778 HRP Santa Cruz). To detect DUSP5, the membranes were blocked with TTBS containing 5% (w/v) BSA then incubated with anti-DUSP5 (1/2000 in TTBS, sc-393801 Santa Cruz). The secondary antibody used was anti-mouse HRP (1/20,000 in TTBS containing 5% (w/v) skim milk, 402334, Calbiochem). Attempts to measure DUSP1 protein with commercial antibodies (Biorbyt, orb317657; Invitrogen, PA5-17973) were unsuccessful in our hands. Each incubation was followed with three washes of 5 min each in TTBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.5). The signal was detected with ECL or ECL Max detection kits (Bio-rad), and densitometric analyses were performed with Image Lab software (Biorad) after background subtraction. For each protein, intensities were calibrated to a calibrator sample, and the calibrated intensity was normalized to the loading control β -actin.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.3 (San Diego, CA, USA). Data are presented as mean \pm S.E.M. of at least three independent cell cultures. Two-way ANOVA Fisher's least significant difference (LSD) was performed to compare DUSP mRNA abundance between treated groups. Differences were considered as significant when $P < 0.05$.

Results

Transient MAPK3/1 phosphorylation and regulation of DUSPs by FGF2

First, we verified that FGF2 induced a transient increase in phosphorylation of MAPK3/1 (Fig. 1). We then determined the effect of FGF2 on abundance of mRNA encoding 14 DUSP members previously detected in sheep granulosa cells. After 2 h exposure, abundance of mRNA of three DUSPs, *DUSP1*, *DUSP5*, and *DUSP6*, was significantly increased in a dose-dependent manner (Fig. 2A), although with differing sensitivities to FGF2: *DUSP6* mRNA abundance was increased by 1 ng/mL FGF2, whereas *DUSP5* and *DUSP1* mRNA abundance were increased by 10 and 50 ng/mL, respectively. A time-course experiment demonstrated significant increase in *DUSP5* and *DUSP6* mRNA abundance by 2 h of treatment, and of *DUSP1* mRNA levels at a later time point (Fig. 2B). No change in abundance of mRNA encoding the other DUSPs was observed in response to FGF2 (not shown).

We then focused on the regulation of abundance of proteins encoded by the three FGF2-regulated DUSPs. Abundance of DUSP6 protein was increased following FGF2 treatment at all time points measured from 4 to 24 h of treatment (Fig. 3B), whereas

DUSP5 protein levels were increased by FGF2 after 6 h of treatment but not at later time points ($P < 0.05$), which was confounded by an increase in DUSP protein levels in controls at the later time points (Fig. 3A). We were unable to detect DUSP1 protein by Western blotting.

Effect of pathway inhibition on DUSP mRNA abundance

We next determined which pathways activated by FGF signaling are involved in DUSP1, DUSP5, and DUSP6 upregulation. Inhibition of PKC with GF109203X did not alter abundance of mRNA encoding these DUSP proteins either under basal or FGF2-stimulated conditions (Fig. 4A). Inhibition of MAPK3/1 with PD98059 significantly decreased FGF2-stimulated *DUSP5* and *DUSP6* expression (Fig. 4B). Inhibition of PLC γ with U73122 significantly decreased FGF2-stimulated but not basal *DUSP6* mRNA levels, whereas in contrast, the inhibitor increased basal *DUSP5* mRNA to levels observed in the presence of FGF2; cotreatment with FGF2 and U73122 did not increase *DUSP5* mRNA abundance above levels observed with either treatment alone. Addition of U73122 also increased basal *DUSP1* mRNA abundance that was not further increased by the addition of FGF2 (Fig. 4C). These data suggest an involvement of PLC γ and MAPK3/1 signaling in the regulation of *DUSP6* mRNA levels, but only MAPK3/1 signaling appears important for *DUSP5* mRNA abundance.

Lastly, we disturbed calcium signaling using the calcium chelator BAPTA-AM or the calcium ionophore A23187, and the three DUSPs measured were differently affected by these treatments. Lowering the calcium levels did not alter basal *DUSP6* mRNA levels but completely suppressed FGF2 stimulation of *DUSP6* mRNA abundance, and treatment

with the ionophore increased *DUSP6* mRNA abundance. Lowering calcium levels increased basal *DUSP5* mRNA levels and had no further effect on FGF2-stimulated *DUSP5* mRNA abundance, and increasing Ca^{2+} levels did not alter *DUSP5* mRNA levels. Abundance of *DUSP1* mRNA was not altered by the calcium chelator but increasing intracellular calcium resulted in a 6-fold increase in *DUSP1* mRNA abundance (Fig. 5).

Discussion

As differential regulation of various MAPKs may determine cell fate, it is important to gain a better understanding of the mechanisms regulating the negative feedback control of MAPK phosphorylation. In the present study, we investigated the intracellular pathways controlling abundance of mRNA encoding three FGF-inducible DUSPs. The main finding of the study is that while MAPK3/1 signaling is critical for stimulating abundance of mRNA encoding both *DUSP5* and *DUSP6*, we found that *DUSP6* mRNA abundance is also regulated through a PLC-calcium pathway (Fig. 6). These data suggest distinct fine control of DUSP family members by at least some growth factors.

This study demonstrates that *DUSP5* and *DUSP6* are the principal DUSPs regulated by FGF2 in bovine granulosa cells, as we have recently shown also in sheep (Relav *et al.* 2021) and as previously described in hens in response to transforming growth factor alpha ($\text{TGF}\alpha$) (Woods & Johnson 2006). Approximately 11 other DUSP members are expressed in the granulosa cells in rats, sheep, and cattle (Herndon *et al.* 2016, Relav *et al.* 2021, present study), and they appear not to be under acute hormonal regulation.

Although the pattern of expression of these DUSPs are similar between sheep and cattle, there appears to be subtle differences between species or cell models: in sheep, *DUSP5* mRNA abundance was transiently increased by FGF2, returning to control levels by 8 h (Relav *et al.* 2021), whereas in the present study abundance of mRNA was numerically highest at 8 h. A difference was also noted for *DUSP1*, for which the FGF2-stimulated increase in mRNA abundance returned to control levels within 2 h in sheep (Relav *et al.* 2021) but was elevated between 4 and 8 h in cattle (present study). The same dose of FGF2 was used in these studies and the culture models are very similar, suggesting a potential, if minor, species difference. The FGF2- stimulated increase in *DUSP6* mRNA abundance is a late event in both sheep and cattle, and *DUSP6* was the only target for which a robust increase in protein levels was observed, suggesting a physiological importance of this particular DUSP.

FGF signaling involves activation of several intracellular pathways (Peluso *et al.* 2001, Miyoshi *et al.* 2010, Jiang *et al.* 2011) and the present data suggest that distinct mechanisms regulate individual DUSP gene products. Increased abundance of *DUSP1*, *DUSP5*, and *DUSP6* mRNA all required MAPK3/1 signaling, in agreement with studies on TGF α -stimulated *DUSP5* and *DUSP6* mRNA abundance in hen granulosa cells (Sen *et al.* 2008) and FSH-stimulated *DUSP5* mRNA in bovine granulosa cells (Woods & Johnson 2006), and with studies in other cell types (Ekerot *et al.* 2008, Kucharska *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010). In a similar vein, none of these DUSP mRNAs were impacted by inhibiting PKC, which was also observed for FSH- stimulated *DUSP5* mRNA abundance in bovine granulosa cells (Sen *et al.* 2008).

There is also an important role of the PLC-calcium signaling in regulating FGF target gene expression. Accumulation of *DUSP6* mRNA is dependent on PLC-calcium, as inhibition of PLC decreased mRNA abundance and increasing intracellular calcium with an ionophore increased mRNA abundance, which is consistent with the regulation of other FGF target genes including *SPRY1* and *SPRY4* (Jiang *et al.* 2011). However, in contrast to *DUSP6*, FGF-stimulated *DUSP5* mRNA accumulation is independent of the PLC-calcium pathway as it was not altered by the inhibition of PLC or the chelation of calcium.

Interestingly, ‘basal’ accumulation of *DUSP5* message appeared to require a decrease in PLC and calcium signaling, whereas paradoxically, basal *DUSP1* mRNA accumulation required a decrease in PLC signaling but increased intracellular calcium levels. The role of calcium in stimulating Dusp1 protein levels has been reported in a rat neuronal-like cell line (Durham & Russo 2000) and fibroblasts (Scimeca *et al.* 1997), and the present data suggest that the PLC and calcium signaling pathways are operating independently in granulosa cells to control FGF-independent expression of *DUSP1*. It should be noted that these ‘basal’ conditions include insulin and FSH, and FSH was shown to stimulate *DUSP1* and *DUSP5* mRNA abundance in bovine cumulus cells (Khan *et al.* 2015), therefore implying a role for PLC and/or calcium in the FSH/insulin control of *DUSP* expression.

In summary, we have determined the major intracellular pathways involved in the regulation of *DUSP1*, *DUSP5*, and *DUSP6* mRNA abundance by FGF2 in bovine granulosa cells. Activation of MAK3/1 phosphorylation is critical for the expression of the three *DUSPs* studied, and a PLC-calcium pathway appears to be important for FGF2-

stimulated *DUSP6* mRNA abundance; as *DUSP6* has been implicated in the regulation of pro-apoptotic MAPK8 in granulosa cells, these data offer insights into mechanisms controlling follicle health.

Declaration of interest

Christopher Price is the co-Editor-in-Chief of Reproduction. He was not involved in the review or editorial process for this paper, on which he is listed as an author.

Funding

This work was supported by FRQ-NT, Québec Canada, and R L received a scholarship from Collectivité Territoriale de Martinique.

Author contribution

R L performed the experiments, analysed data and wrote the manuscript. C A P conceived the study, analysed data and revised the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Dr Parlow for the availability of highly purified FSH.

References

- Cabrita MA & Christofori G** 2008 Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis* **11** 53–62. (<https://doi.org/10.1007/s10456-008-9089-1>)
- Camps M, Nichols A & Arkininstall S** 2000 Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB Journal* **14** 6–16. (<https://doi.org/10.1096/fasebj.14.1.6>)
- Chaves RN, de Matos MH, Buratini J & de Figueiredo JR** 2012 The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reproduction, Fertility, and Development* **24** 905–915. (<https://doi.org/10.1071/RD11318>)
- Damon DH, Lange DL & Hattler BG** 1997 In vitro and in vivo vascular actions of basic fibroblast growth factor (bFGF) in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **30** 278–284. (<https://doi.org/10.1097/00005344-199709000-00002>)
- Donaubauer EM, Law NC & Hunzicker-Dunn ME** 2016 Follicle-stimulating hormone (FSH)-dependent regulation of extracellular regulated kinase (ERK) phosphorylation by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase MKP3. *Journal of Biological Chemistry* **291** 19701–19712. (<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.733972>)
- Durham PL & Russo AF** 2000 Differential regulation of mitogen-activated protein kinase-responsive genes by the duration of a calcium signal. *Molecular Endocrinology* **14** 1570–1582. (<https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0529>)
- Ebisuya M, Kondoh K & Nishida E** 2005 The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science* **118** 2997–3002. (<https://doi.org/10.1242/jcs.02505>)

Ehrengruber MU, Muhlebach SG, Söhrman S, Leutenegger CM, Lester HA & Davidson N 2000 Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus. *Gene* **258** 63–69. ([https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00445-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00445-5))

Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM, Keenan ID, Dickinson RJ, Storey KG & Keyse SM 2008 Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochemical Journal* **412** 287–298. (<https://doi.org/10.1042/BJ20071512>)

Gilmore PM, Quinn JE, Mullan PB, Andrews HN, McCabe N, Carty M, Kennedy RD & Harkin DP 2003 Role played by BRCA1 in regulating the cellular response to stress. *Biochemical Society Transactions* **31** 257–262. (<https://doi.org/10.1042/bst0310257>)

Gutiérrez CG, Campbell BK & Webb R 1997 Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* **56** 608–616. (<https://doi.org/10.1095/biolreprod56.3.608>)

Han P, Guerrero-Netro H, Estienne A, Cao B & Price CA 2017 Regulation and action of early growth response 1 in bovine granulosa cells. *Reproduction* **154** 547–557. (<https://doi.org/10.1530/REP-17-0243>)

Han P, Relav L & Price CA 2020 Regulation of the early growth response-1 binding protein NAB2 in bovine granulosa cells and effect on connective tissue growth factor

expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **518** 111041.
(<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111041>)

Herndon MK, Law NC, Donaubaauer EM, Kyriss B & Hunzicker-Dunn M 2016 Forkhead box O member FOXO1 regulates the majority of follicle-stimulating hormone responsive genes in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **434** 116–126. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.020>)

Huang M, Li X, Jia S, Liu S, Fu L, Jiang X & Yang M 2021 Bisphenol AF induces apoptosis via estrogen receptor beta (ER β) and ROS-ASK1- JNK MAPK pathway in human granulosa cell line KGN. *Environmental Pollution* **270** 116051.
(<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116051>)

Irving-Rodgers HF, van Wezel IL, Mussard ML, Kinder JE & Rodgers RJ 2001 Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction* 761–775. (<https://doi.org/10.1530/rep.0.1220761>)

Jiang ZL, Ripamonte P, Buratini J, Portela VM & Price CA 2011 Fibroblast growth factor-2 regulation of Sprouty and NR4A genes in bovine ovarian granulosa cells. *Journal of Cellular Physiology* **226** 1820–1827. (<https://doi.org/10.1002/jcp.22509>)

Jiang Z, Guerrero-Netro HM, Juengel JL & Price CA 2013 Divergence of intracellular signaling pathways and early response genes of two closely related fibroblast growth factors, FGF8 and FGF18, in bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **375** 97–105. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.017>)

Khan DR, Guillemette C, Sirard MA & Richard FJ 2015 Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence

acquisition. *Molecular Human Reproduction* **21** 688–701.
(<https://doi.org/10.1093/molehr/gav032>)

Kidger AM & Keyse SM 2016 The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Seminars in Cell and Developmental Biology* **50** 125–132. (<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.009>)

Kubosaki A, Tomaru Y, Tagami M, Arner E, Miura H, Suzuki T, Suzuki M, Suzuki H & Hayashizaki Y 2009 Genome-wide investigation of in vivo EGR-1 binding sites in monocytic differentiation. *Genome Biology* **10** R41. (<https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-4-r41>)

Kucharska A, Rushworth LK, Staples C, Morrice NA & Keyse SM 2009 Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cellular Signalling* **21** 1794–1805. (<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.07.015>)

Liu S, Shen M, Li C, Wei Y, Meng X, Li R, Cao Y, Wu W & Liu H 2019 PKC δ contributes to oxidative stress-induced apoptosis in porcine ovarian granulosa cells via activating JNK. *Theriogenology* **131** 89–95. (<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.023>)

Liu Z, Li C, Wu G, Li W, Zhang X, Zhou J, Zhang L, Tao J, Shen M & Liu H 2020 Involvement of JNK/FOXO1 pathway in apoptosis induced by severe hypoxia in porcine granulosa cells. *Theriogenology* **154** 120–127. (<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.019>)

Lo LW, Cheng JJ, Chiu JJ, Wung BS, Liu YC & Wang DL 2001 Endothelial exposure to hypoxia induces Egr-1 expression involving PKC α -mediated Ras/Raf-1/ERK1/2

pathway. *Journal of Cellular Physiology* **188** 304–312.
(<https://doi.org/10.1002/jcp.1124>)

Marshall CJ 1995 Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80** 179–185.
([https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8))

Mason JM, Morrison DJ, Basson MA & Licht JD 2006 Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends in Cell Biology* **16** 45–54. (<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.11.004>)

Matsuda F, Inoue N, Manabe N & Ohkura S 2012 Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development* **58** 44–50. (<https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>)

Miyoshi T, Otsuka F, Yamashita M, Inagaki K, Nakamura E, Tsukamoto N, Takeda M, Suzuki J & Makino H 2010 Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **325** 84–92. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.012>)

Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM & Daly RJ 2009 Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochemical Journal* **418** 475–489. (<https://doi.org/10.1042/bj20082234>)

Peluso JJ, Pappalardo A & Fernandez G 2001 Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC δ -dependent pathway. *Endocrinology* **142** 4203–4211.
(<https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8460>)

- Pfaffl MW** 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** e45. (<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>)
- Price CA & Estienne A** 2018 The life and death of the dominant follicle. *Animal Reproduction* **15** 680–690. (<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0030>)
- Relav L, Estienne A & Price CA** 2021 Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) mRNA and protein abundance is regulated by fibroblast growth factor 2 in sheep granulosa cells and inhibits c-Jun N-terminal kinase (MAPK8) phosphorylation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **531** 111297. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111297>)
- Scimeca JC, Servant MJ, Dyer JO & Meloche S** 1997 Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression. *Oncogene* **15** 717–725. (<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201231>)
- Sen A, Lv L, Bello N, Ireland JJ & Smith GW** 2008 Cocaine- and amphetamine-regulated transcript accelerates termination of follicle-stimulating hormone-induced extracellularly regulated kinase 1/2 and Akt activation by regulating the expression and degradation of specific mitogen-activated protein kinase phosphatases in bovine granulosa cells. *Molecular Endocrinology* **22** 2655–2676. (<https://doi.org/10.1210/me.2008-0077>)
- Silva JM & Price CA** 2000 Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biology of Reproduction* **62** 186–191. (<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.186>)

- Weng Q, Liu Z, Li B, Liu K, Wu W & Liu H** 2016 Oxidative stress induces mouse follicular granulosa cells apoptosis via JNK/FoxO1 pathway. *PLoS ONE* **11** e0167869. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167869>)
- Woods DC & Johnson AL** 2006 Phosphatase activation by epidermal growth factor family ligands regulates extracellular regulated kinase signaling in undifferentiated hen granulosa cells. *Endocrinology* **147** 4931–4940. (<https://doi.org/10.1210/en.2006-0194>)
- Yang MY & Rajamahendran R** 2000 Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction* **63** 1313–1321. (<https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1313>)
- Zhang Z, Kobayashi S, Borczuk AC, Leidner RS, Laframboise T, Levine AD & Halmos B** 2010 Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS- regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis* **31** 577–586. (<https://doi.org/10.1093/carcin/bgq020>)

Tables and figures

Table 1. – Forward (f) and reverse (r) primers used in RT-qPCR.

Gene	Sequence 5' → 3'		Accession number
	Forward	Reverse	
<i>DUSP1</i>	ACCATTTTCGAGGGTCACTACCA	AGCTTGACTCGGTTAGTCCTCA	NM_001046452.2
<i>DUSP2</i>	CTCCAGGGCTCCCTCTTACG	CCTCAAAGTGGTTGGGGCAG	NM_001192179.1
<i>DUSP3</i>	CAGGCAGAACCGTGAGATCG	CTGAGCAGGGTACACTGTGTTT	NM_001076374.1
<i>DUSP5</i>	AGGGGGATATGAGACTTTCTACTCG	GCACTGACTTCCCACACTGAC	NM_001304282.2
<i>DUSP6</i>	CCCCCAACTTGCCGAATCTC	GGCTGATGCCAGCTAAGCAA	NM_001046195.1
<i>DUSP7</i>	GGGCGAGTTCACCTACAAGC	GACAAAGTCGTAGGCGTCGTT	NM_001101294.2
<i>DUSP8</i>	AGCCTGGGTCCAGCCTTAG	GGGGACACCTCCAGCATCT	XM_024987617.1
<i>DUSP10</i>	GAATGAGGGCTGAATGTGCGA	TGTCGTCTAAAGGAGACGGAGG	NM_001034725.2
<i>DUSP11</i>	ACTACCTCCCAGTTGGACAGAG	GGAAAACATTCTTCTGGGGCAAG	NM_001014875.1
<i>DUSP12</i>	TTTGCCACAAGAGGATGACAG	GGAGCACTGTTACCATAACCAG	XM_002685847.6
<i>DUSP14</i>	TTTCCAGACCCAGGACTCCA	ACTTGCATCGTTGGGAGCAA	NM_001075308.1
<i>DUSP15</i>	CGGGCCGTCAGGGCA	CAGGGGCGTCGGCCA	XM_015474259.2
<i>DUSP16</i>	GTTTTCTCACTGTCCTCCTGGG	GGGTGGACTTTCCTTCACAGAG	XM_024992619.1
<i>DUSP18</i>	ATTGCTATGGAAACCGGAGCC	AACTGAACTGGGAAGGCACAC	NM_001034259.1
<i>DUSP19</i>	CAGGACCTTAGCTTGGACTTGAAA	GAACAAGAACCCTCCATCCTTCA	NM_001098878.1
<i>RPL19</i>	TATGGGTATAGGTAAGCGAAAG	TGGCGGTCAATCTTCTTAG	NM_001040516.2
<i>YWHAZ</i>	ACCAACACATCCTATCAGAC	CTCTCAGTAACTGCATTATTAGC	NM_174814.2
<i>SDHA</i>	GAATGGTCTGGAACACTGA	AGTAATCGTACTCGTCAACC	NM_174178.2

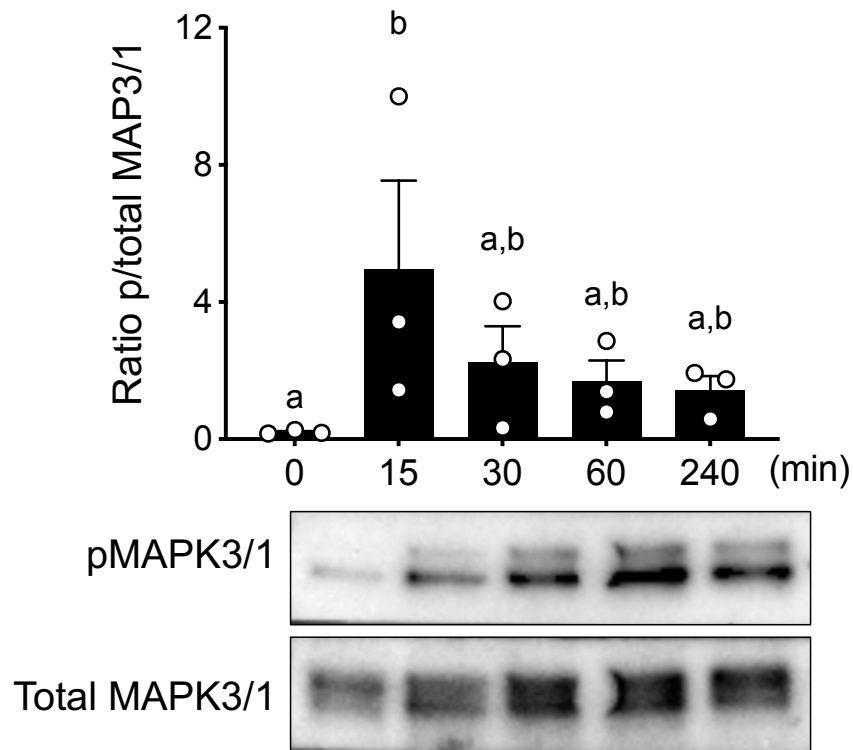


Figure 1 Transient activation of MAPK3/1 phosphorylation by FGF2. Bovine granulosa cells were cultured under serum-free conditions and stimulated on day 5 with 10 ng/mL of FGF2 for the times shown. Total cell protein was extracted for measurement of phospho- MAPK3/1 abundance by Western blot, and the representative blots show samples of one replicate in the same order as the graph. Data are expressed as the ratio of phosphorylated to total MAPK3/1 protein (both bands) and presented as means and S.E.M. of three independent cell cultures with individual data points plotted. Bars with similar letters are not significantly different ($P < 0.05$, Fishers least significant difference (LSD) test).

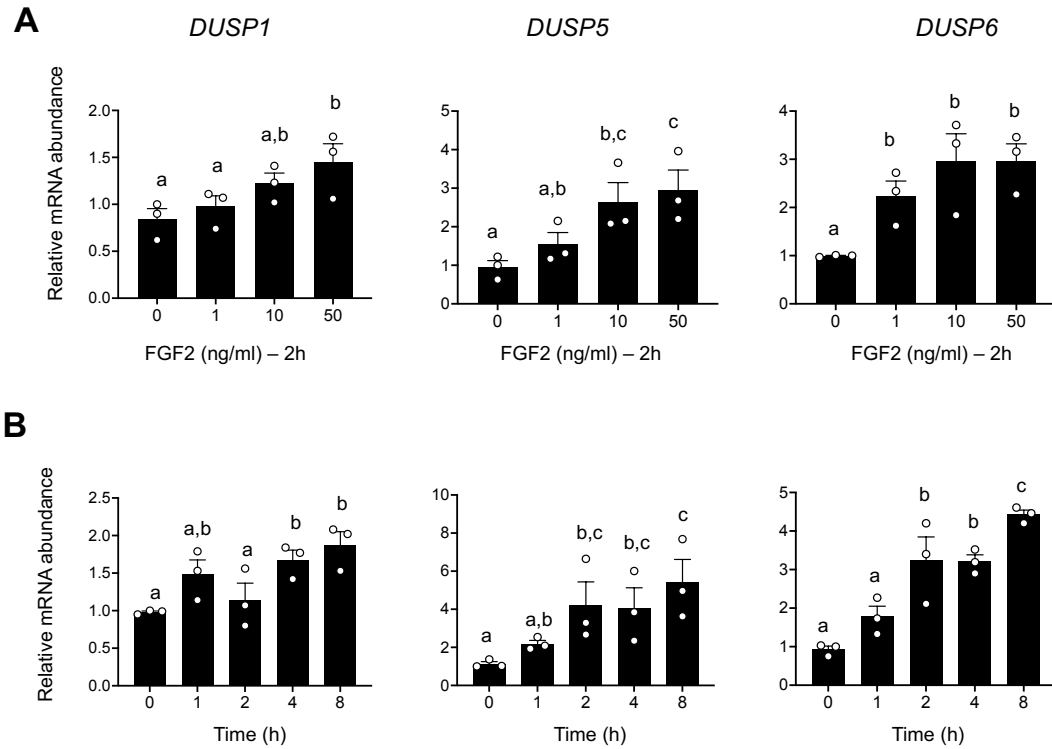


Figure 2 FGF2 stimulated *DUSP1*, *DUSP5* and *DUSP6* mRNA abundance. Bovine granulosa cells were cultured under serum- free conditions and were stimulated on day 5 of culture with 1, 10, or 50 ng/mL FGF2 for 2 h (A), or were stimulated with 10 ng/mL FGF2 for 0, 1, 2, 4, and 8 h (B). Relative mRNA abundance was measured by quantitative PCR (qPCR) and data are expressed as mean and S.E.M. of three independent cell cultures with individual data points plotted. Bars with similar letters are not significantly different ($P < 0.05$, Fishers LSD test).

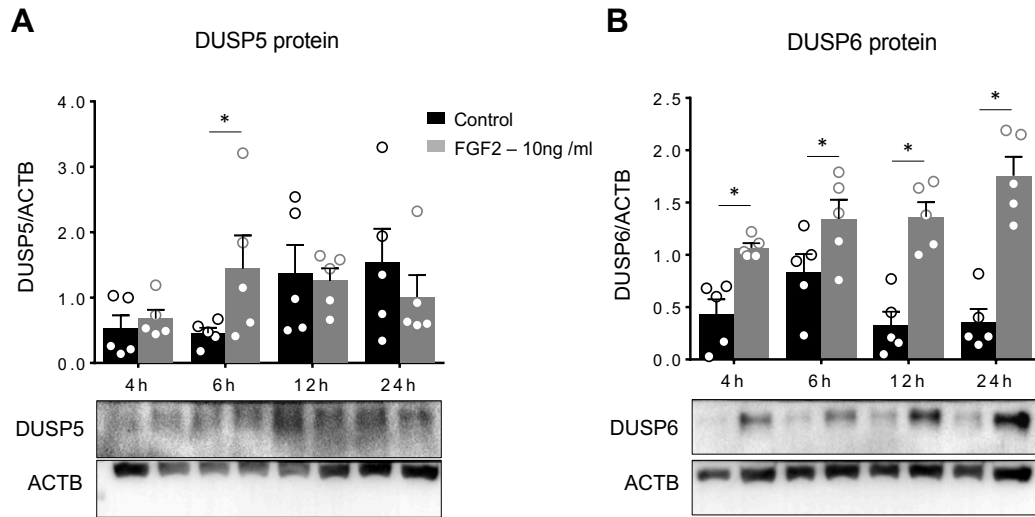


Figure 3 Stimulation of DUSP5 and DUSP6 protein levels by FGF2. Bovine granulosa cells were cultured under serum-free conditions and were stimulated on day 5 of culture with or without 10 ng/mL FGF2 for 4, 6, 12, and 24 h. At the end of culture, total cell protein was harvested for measurement of (A) DUSP5 and (B) DUSP6 by immunoblotting and expressed relative to β -actin (ACTB). In the representative blots, membranes were cut horizontally to contain only bands of the expected size and the lanes correspond to the treatments shown immediately above in the graphs. Results are given as mean and S.E.M. of five independent cell cultures with individual data points plotted, and asterisks indicate significant differences between control and FGF2 treatment ($P < 0.05$, Fishers LSD test).

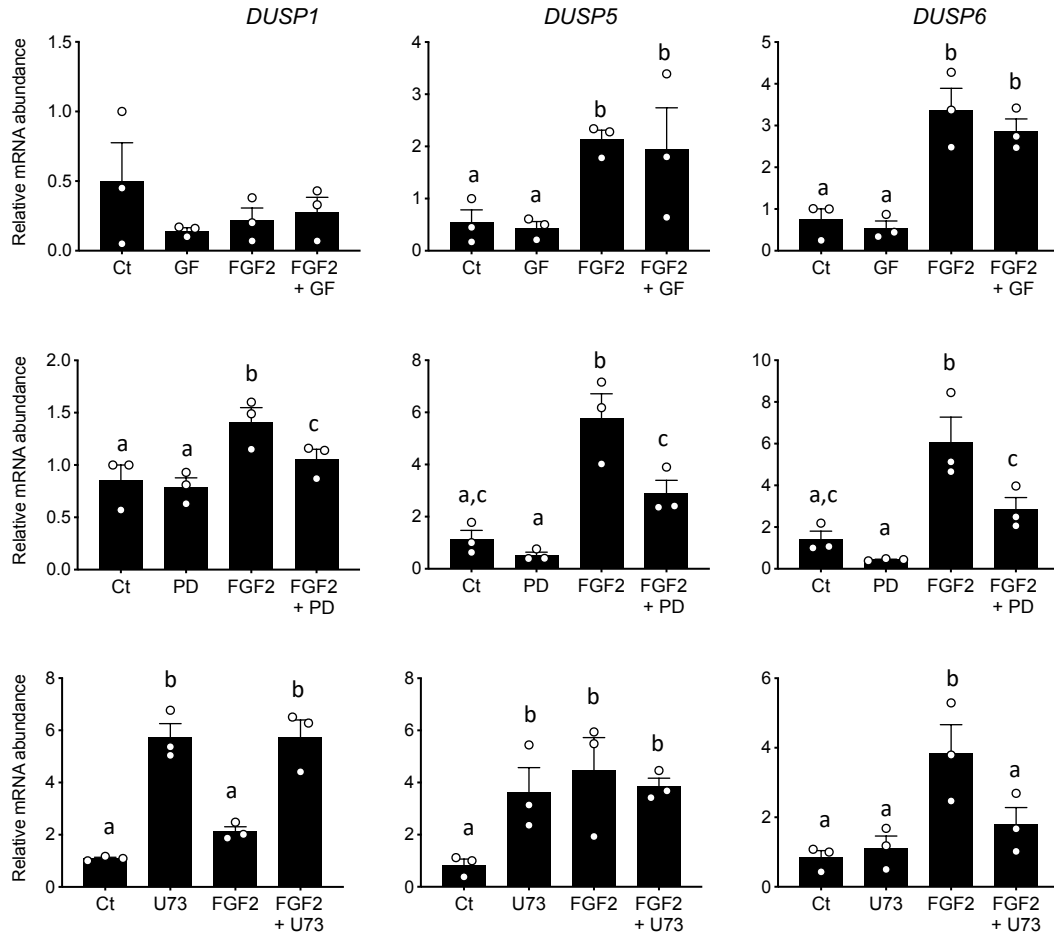


Figure 4 Regulation of DUSP1, DUSP5, and DUSP6 mRNA abundance by mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phospholipase C (PLC), but not PKC, intracellular pathways. Bovine granulosa cells were cultured under serum-free conditions and on day 5 of culture, cells were exposed to inhibitors of (A) PKC (GF; 3 μ M), (B) MAPK (PD; 50 μ M) or (C) PLC (U73; 5 μ M) pathways for 1 h, and then stimulated with FGF2 (10 ng/ mL) for a further 2 h. The control (Ct) was treated with the vehicle, DMSO. Relative mRNA abundance is expressed as mean and S.E.M. of three independent cell cultures with individual data points plotted. Bars with similar letters are not significantly different ($P < 0.05$, Fishers LSD test).

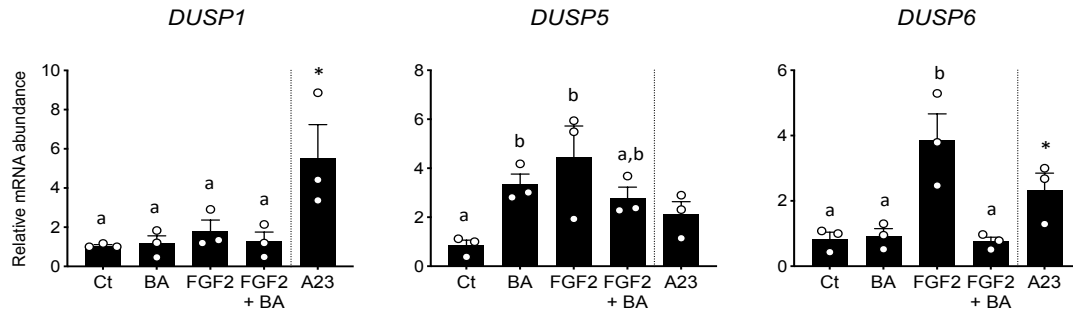


Figure 5 Differential regulation of *DUSP5* and *DUSP6* mRNA levels by calcium signaling. Bovine granulosa cells were cultured under serum-free conditions and on day 5 of culture were exposed to the calcium chelator BAPTA-AM (BA; 10 μ M) for 1 h before stimulation with FGF2 (10 ng/mL) for a further 2 h, or were treated with the calcium ionophore A23187 (10 μ M) for 2 h in the absence of FGF2. Controls (Ct) were treated with vehicle (DMSO). Relative mRNA abundance represents mean and S.E.M. of three independent cell cultures with individual data points plotted. Bars with similar letters are not significantly different; asterisks denote significantly different from controls ($P < 0.05$, Fishers LSD test).

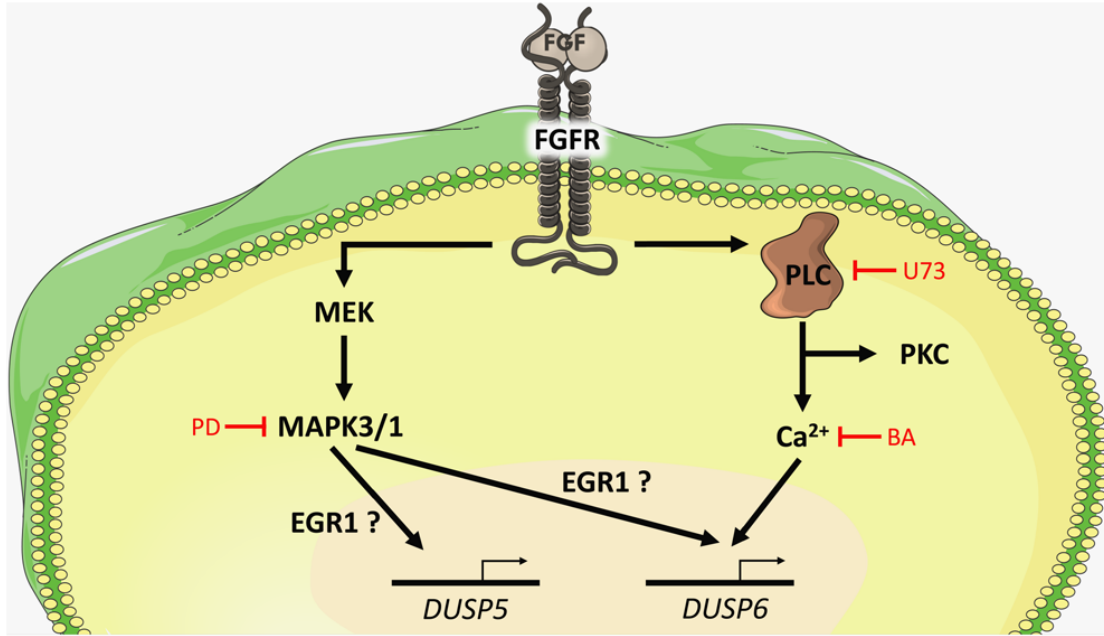


Figure 6 Major intracellular pathways regulating *DUSP5* and *DUSP6* mRNA abundance. FGF2 activates its receptors (FGFR) and initiates a phosphorylation cascade through MAPK/ERK kinase (MEK) and MAPK3/1 kinases to induce expression of *DUSP5* and *DUSP6* in bovine granulosa cells, likely through the transcription factor EGR1. In addition, FGF2 also activates PLC and calcium mobilisation to stimulate *DUSP6* but not *DUSP5* mRNA accumulation. Sites of action of the pathway inhibitors PD98059 (PD) and U73122 (U73), and the calcium chelator (BA) are shown in red.

Chapitre 5 – Discussion générale

5. Discussion générale

5.1. Résumé des résultats

Le bon déroulement de la folliculogénèse ovarienne nécessite l'intégration de stimuli par les différents types cellulaires du follicule (Pepling, 2013). Notamment, les cellules de granulosa qui sont en contact direct avec l'ovocyte, déterminent le développement folliculaire, l'atrésie ou encore initient les événements de la cascade ovulatoire (Almeida et al., 2018; Matsuda et al., 2012). L'une des voies de signalisation intracellulaire importante pour ces processus de prolifération, survie et différenciation cellulaires est la voie des MAPKs (Chang & Karin, 2001). Lorsque la signalisation par les MAPKs est interrompue, la croissance des follicules est limitée, leur structure désorganisée, et les cellules sont dans un état de sénescence. La maturation des complexes cumulus-ovocytes et l'ovulation n'ont pas lieu puisque les follicules ne peuvent répondre aux gonadotropines (H.-Y. Fan et al., 2008, 2009, 2012; H.-Y. Fan & Richards, 2010). À l'opposé, l'hyperstimulation de la voie des MAPKs est à l'origine de cancers ovariens (Steinmetz et al., 2004). L'identification des mécanismes qui contrôlent l'intensité de la phosphorylation des MAPKs est donc cruciale pour mieux caractériser la fonction ovarienne.

Dans le premier article, nous avons rapporté la présence d'ARNm de 16 DUSPs dans les cellules de granulosa de brebis, parmi les 23 MKPs/A-DUSPs ovines : *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP3*, *DUSP5*, *DUSP6*, *DUSP7*, *DUSP8*, *DUSP10*, *DUSP11*, *DUSP12*, *DUSP14*, *DUSP15*, *DUSP16*, *DUSP18*, *DUSP19* et *DUSP22*. Les niveaux de ces ARNm ont été mesurés dans les cellules provenant de follicules antraux, dont les tailles avaient été choisies pour correspondre au début de la folliculogénèse terminale (follicules de 1 à

3 mm), l'acquisition des récepteurs à la LH (follicules de 3 à 5 mm) et au stade pré-ovulatoire (plus de 5mm). L'abondance relative des ARNm pour *DUSP3* et *DUSP8* était plus élevée dans les cellules de granulosa issues des follicules de plus de 5 mm ; les taux de transcrits pour *DUSP22* étaient moindres dans ces follicules, ce qui suggérait une régulation sur le long terme de ces DUSPs sur laquelle nous ne nous sommes pas penchés. En fait, ces phosphatases ont une fonction régulatrice vis-à-vis de phospho-MAPK3/1 (ERK1/2), MAPK8 (JNK) et MAPK14 (p38) dans d'autres tissus (Camps et al., 2000; Caunt et al., 2008; Huang & Tan, 2012). De plus, la phosphorylation à la base de l'activation des kinases est une modification post-traductionnelle intervenant rapidement après un stimulus (Caunt & Keyse, 2013; Marshall, 1995; Traverse et al., 1994). Il apparait donc que l'étude de leur fonction nécessite une échelle de temps plus court – de l'ordre des minutes/heures – que celui suggéré par les variations observées précédentes (jours/semaines). Ceci a motivé nos choix des durées de stimulation pour la suite.

Nous avons pu démontrer la régulation de *DUSP1*, *DUSP5* et *DUSP6* par FGF2 sur de courts temps de stimulation (entre 1h et 24h), et moindrement par FGF8, mais pas par FGF18. Comme attendu, du fait de la proximité phylogénétique des espèces et des modèles de culture cellulaires utilisés, la régulation de l'expression de *DUSP1*, *DUSP5* et *DUSP6* en réponse à FGF2 a été comparable chez la vache et la brebis. La régulation des DUSPs semble d'ailleurs bien conservée, puisque chez la poule, l'activation d'un RTK a augmenté les niveaux de transcrits pour *DUSP5* et *DUSP6* (Woods & Johnson, 2006a). D'après nos résultats, seul le patron des niveaux d'ARNm différait entre la vache et la brebis, laissant supposer une différence entre les espèces. Bien que toutes les deux

sont mono-ovulantes, les mécanismes qui régissent le quota ovulatoire sont différents (Scaramuzzi et al., 2011). En ce sens, le choix de ces deux ruminants, modèles courants en physiologie de la reproduction des espèces mono-ovulantes, offrait une bonne perspective pour la compréhension de l'action des facteurs intra-ovariens impliqués dans la croissance des follicules.

D'autre part, les FGF8 et FGF18 appartiennent tous les deux à la même sous-famille mais ont des effets différents sur la phosphorylation des MAPKs (Z. Jiang et al., 2013). Initialement, nous avons pensé que le facteur pro-apoptotique FGF18 stimulerait l'expression d'une ou plusieurs DUSPs, contrairement aux FGF2 ou FGF8 pro-mitotiques. En effet, dans ce même modèle de cellules de granulosa de vache en culture, FGF18 n'augmentait pas les niveaux de phospho-MAPK3/1 ou phospho-MAPK14 (Bu et al., 2006; V. M. Portela et al., 2015; Uma et al., 2003). De manière surprenante, cela n'a pas été le cas et nous avons pu montrer que l'absence d'activation de la voie des MAPKs par FGF18 ne s'expliquait pas par une expression exacerbée des DUSPs. D'ailleurs, nous avons démontré dans le deuxième article que l'expression de *DUSP1*, *DUSP5* et *DUSP6* était dépendante de MAPK3/1 dont les niveaux de phosphorylation étaient augmentés en présence de FGF2. La régulation de *DUSP6* par ce FGF a également impliqué la PLC et le métabolisme calcique.

Finalement, l'inhibition pharmacologique de *DUSP1* et *DUSP6*, seuls ou conjointement, a permis de proposer un rôle pour *DUSP6* dans la déphosphorylation basale de MAPK8 dans le modèle de culture des cellules de granulosa ovines que nous

avons utilisé. Cette inhibition a également suggéré que l'activité de DUSP6 était nécessaire pour la signalisation de FGF2 par MAPK3/1.

L'ensemble des résultats de cette thèse confirment donc l'hypothèse initiale selon laquelle des A-DUSPs/MKPs sont régulées par des membres de la famille des FGFs et que certaines d'entre elles sont indispensables à la voie de signalisation des MAPKs. L'action paracrine des FGFs est le plus souvent médié par une augmentation de la phosphorylation de ces kinases (Z. Jiang et al., 2013; Miyoshi et al., 2010; Peluso et al., 2001). L'axe FGF-MAPK est impliqué dans différentes fonctions de l'organisme, mais, dans la fonction ovarienne, il permet la progression de la folliculogénèse, via notamment l'activation des follicules primordiaux, la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules somatiques du follicule, ainsi que leur fonction stéroïdogène (Chaves et al., 2012).

5.2. Impacts de l'étude sur le domaine

Dans les cellules de granulosa, il est connu que la signalisation par les FGFs coïncide avec l'expression de régulateurs négatifs de la voie des MAPKs, tels que les membres de la famille Sprouty (SPRY) ciblant RAS, RAF ou encore d'autres protéines en aval des FGFR, mais en amont des MAPKs (Cabrita & Christofori, 2008; Z. L. Jiang et al., 2011; Mason et al., 2006). En revanche, la présence et le rôle de régulateurs directs des MAPKs n'avait, jusque-là, été que peu investiguée dans ce contexte physiologique. Pourtant, ailleurs dans l'organisme des mammifères, essentiellement durant

l'organogenèse des membres, de la tête et du cou, l'action des FGFs était corrélée à l'expression spatio-temporelle des MKPs/A-DUSPs (Dickinson et al., 2002; Eblaghie et al., 2003). Nous apportons avec ces études, une meilleure caractérisation de l'action des FGFs dans les cellules de granulosa. Ceci contribue à enrichir les connaissances des mécanismes de contrôle paracrine de la folliculogenèse chez les mammifères.

Ces résultats ouvrent également la voie pour l'identification de nouveaux marqueurs de la fertilité. En fait, chez les patients atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope congénital (HHC), des mutations pour des régulateurs de la voie des MAPKs, dont *DUSP6*, ont été identifiées. Sur le plan clinique, l'HHC se manifeste par un retard ou absence de la puberté et une infertilité. Dans ce travail, l'impact de la mutation sur la fonction protéique n'avait pas été investigué (Miraoui et al., 2013). De manière concomitante, une analyse génomique chez la vache a identifié un polymorphisme nucléotidique (SNP) à proximité du gène *DUSP6*. Les auteurs rapportent que ce SNP pourrait être associé à la fertilité mais que l'analyse des voies de signalisation n'a pas permis de faire la corrélation (Minozzi et al., 2013). En ce sens, notre présente étude complète les connaissances actuelles relatives à l'implication des DUSPs dans la fonction ovarienne. Explorer ce domaine pourrait mener à les sélectionner en tant que cibles thérapeutiques, ce qui améliorerait la santé des follicules et ainsi, la fertilité des ruminants.

5.3. Limites de l'étude

Dans la présente étude, nous avons choisi une approche utilisant des cultures primaires sans sérum de cellules de granulosa de ruminants. Les cellules étaient issues de

petits follicules antraux et, dans ces conditions, elles conservent leur capacité à répondre à la FSH et à l'insuline présents dans le milieu de culture par la production d'œstradiol et la prolifération cellulaire. De plus, elles interagissent physiquement grâce à la formation d'amas cellulaire tout au long de la culture cellulaire (B. K. Campbell et al., 1996; Gutiérrez et al., 1997). Ces conditions sont nécessaires pour qu'elles maintiennent un phénotype proche de celui des cellules dans les follicules en croissance, et ainsi éviter une différenciation. Il s'agissait donc de modèles intéressants pour étudier *in vitro* la régulation des DUSPs par les hormones paracrines et autocrines durant la croissance folliculaire. D'ailleurs, les données obtenues ont permis de cibler les DUSP1, DUSP5 et DUSP6 comme faisant partie de la signalisation par FGF2-MAPKs. Il faut cependant noter la présence de FSH et d'insuline dans les milieux de culture. La FSH est connue pour réguler *DUSP1* dans les cellules de granulosa de vache, tandis que l'insuline est connue pour agir à travers un RTK (Critchley et al., 2018; Khan et al., 2015a, 2015b). Étant donné que leur présence est nécessaire pour maintenir le phénotype des cellules en culture, il s'agit donc des conditions basales.

Comme observé dans la deuxième étude, la phosphorylation de MAPK3/1 intervient transitoirement à 15 min en réponse à FGF2 alors que les protéines DUSP1, DUSP5 et DUSP6 sont augmentées après plusieurs heures de traitement chez la vache et la brebis. Ceci pose donc la question de savoir si en réponse à FGF2, ces DUSPs sont modifiées de manière post-traductionnelle tel que rapporté : la phosphorylation de DUSP1 sur les résidus Ser296/323 (en vue d'une dégradation) ou 359/364 (pour une stabilisation), et celle de DUSP6 sur les Ser159/174/197 (précédant une dégradation) (J.-

M. Brondello et al., 1997; Cao et al., 2006; Moosavi et al., 2017; Patterson et al., 2009). L'indisponibilité d'anticorps spécifiques à ces formes phosphorylées n'a pas permis de tester cette hypothèse. De manière générale, les anticorps qui pourraient reconnaître les DUSP1, DUSP5 et DUSP6 chez la vache ou la brebis sont très peu nombreux. Le choix des anticorps utilisés ou testés dans la présente étude s'est donc fait suite aux comparaisons des peptides immunogènes avec les DUSPs que nous souhaitions détecter. Des immunoblots ont ensuite permis de les valider : le test de leur spécificité reposait sur la présence d'une seule bande sur la membrane, à la taille attendue (39 kDa pour DUSP1, 42 ou 47 kDa respectivement pour DUSP5, 42 kDa pour DUSP6).

Concernant l'exploration du rôle des DUSPs ciblées dans l'article 1, nous avons utilisé une approche pharmacologique qui a permis d'inhiber conjointement DUSP1 et DUSP6 d'une part, et DUSP1 seul d'autre part. A ce jour, aucun inhibiteur pharmacologique spécifique à DUSP6 n'a été identifié. D'autres approches existent, mais peuvent également être discutées. On peut citer par exemple la méthode CRISPR-Cas9 qui permettrait de supprimer spécifiquement l'expression de DUSP1, DUSP5, DUSP6. Dans notre modèle de culture où les cellules forment des amas, il est difficile de garantir que le matériel d'édition du génome sera délivré en quantité suffisante pour supprimer l'expression.

5.4. Perspectives

Pour cette thèse nous avons choisi de nous intéresser aux cellules de granulosa car elles sont en contact étroit avec l'ovocyte tout au long de la folliculogenèse et sont au

cœur de la fonction des follicules (Clarke, 2018; Duncan, 2019; Silva & Price, 2000). Compte-tenu de la présence de FGF2 et de ses récepteurs au niveau des cellules de la thèque, ces DUSPs pourraient y être présentes et régulées de manière similaire (Schams et al., 2009; Shikone et al., 1992; Shimizu et al., 2002; Wandji et al., 1992). L'étude de leur régulation pourrait alors être réalisée à l'aide de cultures de cellules de la thèque tel que décrites précédemment (Glister et al., 2005; Guerrero-Netro et al., 2017). Ceci offrirait une vision plus globale de leur présence, rôle et régulation dans l'ovaire.

Dans cette optique, il serait intéressant de se pencher sur un autre moment de la folliculogenèse : la période péri-ovulatoire. La voie des MAPKs est stimulée par différents facteurs dans l'ovaire, incluant les RTK mais aussi les gonadotropines LH et FSH. Le rôle de FSH dans la régulation de l'expression de DUSP1, bien que peu clair, est reportée chez la vache et le rat (Herndon et al., 2016; Khan et al., 2015a, 2015b). Concernant DUSP6, son rôle dans l'inactivation de MAPK3/1 à la suite d'une signalisation par la FSH a été étudié dans les cellules de granulosa de rat, mais la régulation de sa traduction n'a pas été investiguée. La question de la régulation de DUSP1 et DUSP6 par la LH se pose alors.

La LH constitue le signal de l'ovulation. Elle active indirectement la voie des MAPKs en permettant la synthèse des ligands pour le récepteur à l'EGF (EGFR) de la famille des RTKs (Panigone et al., 2008). D'autres voies, telle que la voie Hippo, peuvent également intervenir dans le contrôle des événements de la période péri-ovulatoire. Cette voie met en relation les Yes-associated proteins (YAP) qui s'associent au TEA domain family member (TEAD) afin de moduler l'expression de gènes cibles (Sun & Diaz, 2019; Varelas, 2014; Yu & Guan, 2013). À son tour, la voie Hippo peut être contrôlée par

l'EGFR, qui active la cascade des MAPKs (R. Fan et al., 2013; Zinatizadeh et al., 2019). Les DUSP1, DUSP5 et DUSP6 pourraient donc être régulées à la fois par la LH et par la voie Hippo dans les cellules de granulosa pré-ovulatoires.

De plus, la LH augmente les niveaux de calcium intracellulaire (Flores et al., 1998; Y. Wang et al., 2013). Ce sont tous deux des mécanismes qui, dans nos expériences, ont permis d'augmenter sélectivement les niveaux d'ARNm de *DUSP1*, *DUSP5* ou *DUSP6*. De ce fait, nous avons entrepris, grâce à une collaboration, de déterminer les modalités de régulation de DUSP1 et DUSP6 dans un modèle de culture de cellules de granulosa bovines pré-ovulatoire (Annexe 1). Dans ce modèle *in vitro* bien caractérisé, la LH stimule l'expression de gènes clés pour la cascade ovulatoire, notamment, *AREG*, *EREG* (montré à l'Annexe 2 – figure 1A), et *PTGS2* (V. M. Portela et al., 2011; Zamberlam et al., 2014). Nos résultats préliminaires ont indiqué que la LH diminuait transitoirement l'expression de *DUSP6* ($p < 0,05$; Annexe 2 – figure 1B) mais n'affectait pas celle de *DUSP1*. D'après ces premières données, la LH semble diminuer les niveaux d'ARNm pour *DUSP6* dans un contexte où la voie Hippo permettrait leur accumulation (Annexe 3 – Figure 2A). Bien que l'inhibition de la voie Hippo permet une accumulation des transcrits pour *DUSP1*, la présence de LH ne semble pas les affecter (Annexe 3 – Figure 2A ; Annexe 4 – Figure 3B). La question de déterminer l'impact d'EGF reste dans la régulation de *DUSP1* et *DUSP6* reste cependant entière, car dans certains cas, les données préliminaires montrent une tendance à l'augmentation de leurs niveaux d'ARNm (Annexe 4 – Figure 3B). Des expériences supplémentaires sont requises pour compléter ces observations préliminaires et dresser un portrait de la fine régulation de DUSP1 et

DUSP6 (et peut-être d'autres DUSPs) qu'il semble y avoir durant la période péri-ovulatoire.

Enfin, il serait intéressant d'envisager une approche intégrative pour étudier le rôle de DUSP6 notamment, dans la folliculogénèse. Un exemple pourrait être la création d'une lignée *Amhr2^{Cre/+}Dusp6^{loxP/loxP}*. Chez ces animaux, la présence de l'enzyme Cre-recombinase permettrait l'excision de la séquence codant pour Dusp6, dans les cellules de granulosa à partir du stade de follicule primaire (Rodriguez et al., 2019). Les avantages que représentent un tel modèle sont : (1) la possibilité d'étudier la fonction d'une cible particulière à tous les stades de la folliculogénèse et ainsi en déterminer son implication dans ce processus, (2) conserver l'environnement hormonal requis pour la fonction de l'ovaire, en particulier la régulation hypothalamo hypophysaire. On pourrait ainsi s'attendre à des défauts de formation des follicules primordiaux et/ou une augmentation de l'activation des follicules primordiaux par rapport au rôle de JNK dans ces processus (Bertoldo et al., 2016; W. Niu et al., 2016). Et, puisque l'activation de MAPK3/1 est nécessaire pour les étapes terminales de la folliculogénèse, en particulier l'expansion du cumulus, l'ovulation et la lutéinisation, il serait attendu un impact négatif sur ces processus dans le modèle proposé (H.-Y. Fan et al., 2008, 2009; Hsieh et al., 2007; Panigone et al., 2008). De plus, les niveaux des hormones stéroïdes pourraient être altérés comme dans le tableau clinique de l'hypogonadisme hypogonadotrope, associé à des mutations pour *DUSP6* ou d'autres régulateurs des MAPKs (Miraoui et al., 2013).

Conclusion générale

En conclusion, ces études ont démontré la présence, mais surtout la régulation de DUSPs dans les cellules de granulosa de deux espèces de ruminants. L'expression des phosphatases DUSP1, DUSP5 et DUSP6 a été stimulée par FGF2 dans les cellules de granulosa de brebis, mais aussi de vache, ce qui suggère un rôle hautement conservé pour ces trois protéines. L'augmentation transitoire de la phosphorylation de MAPK3/1 est apparue essentielle pour l'expression des trois DUSPs et, une voie impliquant la PLC et le calcium semble être importante pour stimuler l'accumulation de l'ARNm pour *DUSP6* en réponse à FGF2. La fine régulation de DUSP6 dans les cellules de granulosa est en accord avec son implication dans la régulation de MAPK8 pro-apoptotique. Ces données obtenues chez la vache et la brebis, espèces mono-ovulatoires, modèles en endocrinologie de la reproduction, offrent un aperçu des mécanismes de contrôle paracrine de la santé des follicules. Ces résultats ouvrent également la voie pour l'identification de marqueurs de la fertilité ou encore la sélection de cibles thérapeutiques qui amélioreraient la santé des follicules et ainsi, la fonction de reproduction des ruminants.

Références bibliographiques

- Adams, G. P. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 54, 17-32.
- Adams, G. P., Singh, J., & Baerwald, A. R. (2012). Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology*, 78(8), 1733-1748. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.010>
- Ahmad, M. K., Abdollah, N. A., Shafie, N. H., Yusof, N. M., & Razak, S. R. A. (2018). Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6): A review of its molecular characteristics and clinical relevance in cancer. *Cancer Biology & Medicine*, 15(1), 14-28. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0107>
- Akison, L. K., Robertson, S. A., Gonzalez, M. B., Richards, J. S., Smith, C. W., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2018). Regulation of the ovarian inflammatory response at ovulation by nuclear progesterone receptor. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 79(6), e12835. <https://doi.org/10.1111/aji.12835>
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal*, 15(23), 6541-6551.
- Almeida, C. P., Ferreira, M. C. F., Silveira, C. O., Campos, J. R., Borges, I. T., Baeta, P. G., Silva, F. H. S., Reis, F. M., & Puerto, H. L. D. (2018). Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells—A review. *Cell Biology International*, 42(10), 1276-1281. <https://doi.org/10.1002/cbin.11036>
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., & Mustelin, T. (2004). Protein Tyrosine Phosphatases in the Human

Genome. *Cell*, 117(6), 699-711. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018>

Amsterdam, A., Kannan, K., Givol, D., Yoshida, Y., Tajima, K., & Dantes, A. (2001). Apoptosis of Granulosa Cells and Female Infertility in Achondroplastic Mice Expressing Mutant Fibroblast Growth Factor Receptor 3G374R. *Molecular Endocrinology*, 15(9), 1610-1623. <https://doi.org/10.1210/mend.15.9.0700>

Armstrong, D. G., Gong, J. G., & Webb, R. (2003). Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 61, 403-414.

Arnaud-Dabernat, S., Yadav, D., & Sarvetnick, N. (2008). FGFR3 contributes to intestinal crypt cell growth arrest. *Journal of Cellular Physiology*, 216(1), 261-268. <https://doi.org/10.1002/jcp.21401>

Baird, A., & Hsueh, A. J. W. (1986). Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone : Differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regulatory Peptides*, 16(3-4), 243-250. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(86\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0167-0115(86)90023-6)

Balasse, M. (Éd.). (2017). *Regards croisés—Quand les sciences archéologiques rencontrent l'innovation*. Éditions des Archives contemporaines.

Bartlewski, P. M., Baby, T. E., & Giffin, J. L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, 124(3), 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.024>

Beenken, A., & Mohammadi, M. (2009). The FGF family : Biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(3), 235-253. <https://doi.org/10.1038/nrd2792>

Berisha, B., & Schams, D. (2005). Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 305-317. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.035>

- Berisha, B., Sinowatz, F., & Schams, D. (2004). Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 67(2), 162-171. <https://doi.org/10.1002/mrd.10386>
- Bermudez, O., Jouandin, P., Rottier, J., Bourcier, C., Pagès, G., & Gimond, C. (2011). Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 276-284. <https://doi.org/10.1002/jcp.22339>
- Bermudez, O., Pagès, G., & Gimond, C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases : Critical roles in development and cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(2), C189-C202. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00347.2009>
- Bertoldo, M. J., Bernard, J., Duffard, N., Tsikis, G., Alves, S., Calais, L., Uzbekova, S., Monniaux, D., Mermillod, P., & Locatelli, Y. (2016). Inhibitors of c-Jun phosphorylation impede ovine primordial follicle activation. *Molecular Human Reproduction*, 22(5), 338-349. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw012>
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.-J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & Development*, 17(16), 1969-1978. <https://doi.org/10.1101/gad.1107303>
- Branney, P. A., Faas, L., Steane, S. E., Pownall, M. E., & Isaacs, H. V. (2009). Characterisation of the Fibroblast Growth Factor Dependent Transcriptome in Early Development. *PLoS ONE*, 4(3), e4951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004951>
- Braw-Tal, R., & Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle

growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1), 165-171.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090165>

Bremmer, S. C., Hall, H., Martinez, J. S., Eissler, C. L., Hinrichsen, T. H., Rossie, S., Parker, L. L., Hall, M. C., & Charbonneau, H. (2012). Cdc14 Phosphatases Preferentially Dephosphorylate a Subset of Cyclin-dependent kinase (Cdk) Sites Containing Phosphoserine*, ♦. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1662-1669.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.281105>

Brondello, J. M., Pouysségur, J., & McKenzie, F. R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5449), 2514-2517. <https://doi.org/10.1126/science.286.5449.2514>

Brondello, J.-M., Brunet, A., Pouysségur, J., & McKenzie, F. R. (1997). The Dual Specificity Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1 and -2 Are Induced by the p42/p44MAPK Cascade*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 1368-1376.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.1368>

Brown, C., LaRocca, J., Pietruska, J., Ota, M., Anderson, L., Duncan Smith, S., Weston, P., Rasoulpour, T., & Hixon, M. L. (2010). Subfertility Caused by Altered Follicular Development and Oocyte Growth in Female Mice Lacking PKBalpha/Akt11. *Biology of Reproduction*, 82(2), 246-256. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077925>

Bu, S. Z., Huang, Q., Jiang, Y. M., Min, H. B., Hou, Y., Guo, Z. Y., Wei, J. F., Wang, J. W., Ni, X., & Zheng, S. S. (2006). P38 Mitogen-activated protein kinases is required for counteraction of 2-methoxyestradiol to estradiol-stimulated cell proliferation and induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells via phosphorylation Bcl-2. *Apoptosis*, 11(3), 413-425. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-4064-z>

Buffet, C., Catelli, M.-G., Hecale-Perlemoine, K., Bricaire, L., Garcia, C., Gallet-Dierick, A., Rodriguez, S., Cormier, F., & Groussin, L. (2015). Dual Specificity Phosphatase 5, a Specific Negative Regulator of ERK Signaling, Is Induced by Serum Response Factor and Elk-1 Transcription Factor. *PLOS ONE*, *10*(12), e0145484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145484>

Buratini, J., Pinto, M. G. L., Castilho, A. C., Amorim, R. L., Giometti, I. C., Portela, V. M., Nicola, E. S., & Price, C. A. (2007). Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in Bovine Follicles. *Biology of Reproduction*, *77*(4), 743-750. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062273>

Buratini, J., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Glapinski, V. F., Pinto, M. G. L., Giometti, I. C., Barros, C. M., Cao, M., Nicola, E. S., & Price, C. A. (2005). Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, *130*(3), 343-350. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00642>

Cabrita, M. A., & Christofori, G. (2008). Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis*, *11*(1), 53-62. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9089-1>

Camaioni, A., Klinger, F. G., Campagnolo, L., & Salustri, A. (2018). The Influence of Pentraxin 3 on the Ovarian Function and Its Impact on Fertility. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02808>

Campbell, A. M., & Zhang, Z.-Y. (2014). Phosphatase of regenerating liver : A novel target for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *18*(5), 555-569. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.892926>

- Campbell, B. K., Scaramuzzi, R. J., & Webb, R. (1996). Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction and Fertility*, *106*(1), 7-16.
- Camps, M., Nichols, A., & Arkininstall, S. (2000). Dual specificity phosphatases : A gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal*, *14*(1), 6-16.
- Cao, M., Nicola, E., Portela, V. M., & Price, C. A. (2006). Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Matrix Biology*, *25*(6), 342-354. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.05.005>
- Caunt, C. J., & Keyse, S. M. (2013). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) : Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS Journal*, *280*(2), 489-504. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x>
- Caunt, C. J., Rivers, C. A., Conway-Campbell, B. L., Norman, M. R., & McArdle, C. A. (2008). Epidermal Growth Factor Receptor and Protein Kinase C Signaling to ERK2 : SPATIOTEMPORAL REGULATION OF ERK2 BY DUAL SPECIFICITY PHOSPHATASES *. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(10), 6241-6252. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706624200>
- Chakravarthi, V. P., Ghosh, S., Roby, K. F., Wolfe, M. W., & Rumi, M. A. K. (2020). A Gatekeeping Role of ESR2 to Maintain the Primordial Follicle Reserve. *Endocrinology*, *161*(4), bqaa037. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa037>
- Chakravarthi, V. P., Ratri, A., Masumi, S., Borosha, S., Ghosh, S., Christenson, L. K., Roby, K. F., Wolfe, M. W., & Rumi, M. A. K. (2021). Granulosa cell genes that regulate ovarian follicle development beyond the antral stage : The role of estrogen receptor β .

Molecular and Cellular Endocrinology, 528, 111212.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111212>

Chan, D. W., Liu, V. W. S., Tsao, G. S. W., Yao, K.-M., Furukawa, T., Chan, K. K. L., & Ngan, H. Y. S. (2008a). Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(9), 1742-1750. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn167>

Chan, D. W., Liu, V. W. S., Tsao, G. S. W., Yao, K.-M., Furukawa, T., Chan, K. K. L., & Ngan, H. Y. S. (2008b). Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(9), 1742-1750. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn167>

Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40. <https://doi.org/10.1038/35065000>

Chaves, R. N., Lima-Verde, I. B., Celestino, J. J. H., Duarte, A. B. G., Alves, A. M. C. V., Matos, M. H. T., Campello, C. C., Name, K. P. O., Bao, S. N., Buratini, J., & Figueiredo, J. R. (2010). Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, 39(4), 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.06.006>

Chaves, R. N., Tavares de Matos, M. H., Buratini, J., & Ricardo de Figueiredo, J. (2012). The fibroblast growth factor family : Involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(7), 905. <https://doi.org/10.1071/RD11318>

Chen, H.-F., Chuang, H.-C., & Tan, T.-H. (2019). Regulation of Dual-Specificity Phosphatase (DUSP) Ubiquitination and Protein Stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112668>

- Chong, H., Vikis, H. G., & Guan, K.-L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cellular Signalling*, *15*(5), 463-469. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00139-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00139-0)
- Clarke, H. J. (2018). Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *WIREs Developmental Biology*, *7*(1), e294. <https://doi.org/10.1002/wdev.294>
- Combarous, Y., Guillou, F., Martinat, N., & Cahoreau, C. (1984). [Origin of the FSH + LH double activity of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG)]. *Annales D'endocrinologie*, *45*(4-5), 261-268.
- Critchley, W. R., Pellet-Many, C., Ringham-Terry, B., Harrison, M. A., Zachary, I. C., & Ponnambalam, S. (2018). Receptor Tyrosine Kinase Ubiquitination and De-Ubiquitination in Signal Transduction and Receptor Trafficking. *Cells*, *7*(3), 22. <https://doi.org/10.3390/cells7030022>
- Croker, B. A., Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2008). SOCS Regulation of the JAK/STAT Signalling Pathway. *Seminars in cell & developmental biology*, *19*(4), 414-422. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.010>
- Dengjel, J., Kratchmarova, I., & Blagoev, B. (2009). Receptor tyrosine kinase signaling : A view from quantitative proteomics. *Molecular BioSystems*, *5*(10), 1112-1121. <https://doi.org/10.1039/B909534A>
- Denkert, C., Schmitt, W. D., Berger, S., Reles, A., Pest, S., Siegert, A., Lichtenegger, W., Dietel, M., & Hauptmann, S. (2002). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer*, *102*(5), 507-513. <https://doi.org/10.1002/ijc.10746>

- DesMarais, V., Ghosh, M., Eddy, R., & Condeelis, J. (2005). Cofilin takes the lead. *Journal of Cell Science*, *118*(1), 19-26. <https://doi.org/10.1242/jcs.01631>
- Diaz, F. J., Anderson, L. E., Wu, Y. L., Rabot, A., Tsai, S. J., & Wiltbank, M. C. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ α production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *191*(1), 65-80. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00056-4)
- Dickinson, R. J., Eblaghie, M. C., Keyse, S. M., & Morriss-Kay, G. M. (2002). Expression of the ERK-specific MAP kinase phosphatase PYST1/MKP3 in mouse embryos during morphogenesis and early organogenesis. *Mechanisms of Development*, *113*(2), 193-196. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00024-2)
- Dickinson, R. J., & Keyse, S. M. (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci*, *119*(22), 4607-4615. <https://doi.org/10.1242/jcs.03266>
- Diskin, M. G., & Kenny, D. A. (2016). Managing the reproductive performance of beef cows. *Theriogenology*, *86*(1), 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.052>
- Donaubauer, E. M., Law, N. C., & Hunzicker-Dunn, M. E. (2016). Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-dependent Regulation of Extracellular Regulated Kinase (ERK) Phosphorylation by the Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase MKP3. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(37), 19701-19712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.733972>
- Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of Reproduction*, *5*(3), 143-152. <https://doi.org/10.1530/revreprod/5.3.143>

- Drummond, A. E., Tellbach, M., Dyson, M., & Findlay, J. K. (2007). Fibroblast Growth Factor-9, a Local Regulator of Ovarian Function. *Endocrinology*, *148*(8), 3711-3721. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1668>
- Duffy, D. M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M., & Curry, T. E. (2019). Ovulation : Parallels With Inflammatory Processes. *Endocrine Reviews*, *40*(2), 369-416. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00075>
- Duncan, W. C. (2019). Physiology of Ovulation. Dans G. Kovacs, A. Rutherford, & D. K. Gardner (Éds.), *How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success* (1^{re} éd., p. 1-21). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316756744.001>
- Ebisuya, M., Kondoh, K., & Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity : Mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science*, *118*(14), 2997-3002. <https://doi.org/10.1242/jcs.02505>
- Eblaghie, M. C., Lunn, J. S., Dickinson, R. J., Münsterberg, A. E., Sanz-Ezquerro, J.-J., Farrell, E. R., Mathers, J., Keyse, S. M., Storey, K., & Tickle, C. (2003). Negative Feedback Regulation of FGF Signaling Levels by Pyst1/MKP3 in Chick Embryos. *Current Biology*, *13*(12), 1009-1018. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00381-6)
- Ekerot, M., Stavridis, M. P., Delavaine, L., Mitchell, M. P., Staples, C., Owens, D. M., Keenan, I. D., Dickinson, R. J., Storey, K. G., & Keyse, S. M. (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochemical Journal*, *412*(Pt 2), 287-298. <https://doi.org/10.1042/BJ20071512>
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., & Matzuk, M. M. (1999). Molecular

characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *13*(6), 1018-1034. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0309>

Eswarakumar, V. P., Lax, I., & Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *16*(2), 139-149. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.001>

Fan, H.-Y., Liu, Z., Mullany, L. K., & Richards, J. S. (2012). Consequences of RAS and MAPK activation in the ovary : The good, the bad and the ugly. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *356*(1-2), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.12.005>

Fan, H.-Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., Hedrick, S. M., & Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5929), 938-941. <https://doi.org/10.1126/science.1171396>

Fan, H.-Y., & Richards, J. S. (2010). Minireview : Physiological and Pathological Actions of RAS in the Ovary. *Molecular Endocrinology*, *24*(2), 286-298. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0251>

Fan, H.-Y., Shimada, M., Liu, Z., Cahill, N., Noma, N., Wu, Y., Gossen, J., & Richards, J. S. (2008). Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development*, *135*(12), 2127-2137. <https://doi.org/10.1242/dev.020560>

Fan, R., Kim, N.-G., & Gumbiner, B. M. (2013). Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, 110(7), 2569-2574. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216462110>

Farooq, A., & Zhou, M.-M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases.

Cellular Signalling, 16(7), 769-779. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.12.008>

Flores, J. A., Aguirre, C., Sharma, O. P., & Veldhuis, J. D. (1998). Luteinizing hormone (LH) stimulates both intracellular calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) mobilization and transmembrane cation influx in single ovarian (granulosa) cells : Recruitment as a cellular mechanism of

LH- $[Ca^{2+}]_i$ dose response. *Endocrinology*, 139(8), 3606-3612.

<https://doi.org/10.1210/endo.139.8.6162>

Fon Tacer, K., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2010). Research

Resource : Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in

Adult Mouse. *Molecular Endocrinology*, 24(10), 2050-2064.

<https://doi.org/10.1210/me.2010-0142>

Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., & Crowe, M. A. (2011).

Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3), 163-169.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>

Fortune, J. E., Yang, M. Y., & Muruvi, W. (2011). In vitro and in vivo regulation of

follicular formation and activation in cattle. *Reproduction, fertility, and development*,

23(1), 15-22. <https://doi.org/10.1071/RD10250>

Frémin, C., & Meloche, S. (2010). From basic research to clinical development of

MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 3(1), 8.

<https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-8>

Fu, X., Chen, C., Li, S., Han, D., Wang, Y., Yuan, B., Gao, Y., Zhang, J., & Jiang, H.

(2019). Dual-specificity phosphatase 1 regulates cell cycle progression and apoptosis in cumulus cells by affecting mitochondrial function, oxidative stress, and autophagy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 317(6), C1183-C1193. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00012.2019>

Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luiro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H., & Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25(3), 279-283. <https://doi.org/10.1038/77033>

Gasperin, B. G., Ferreira, R., Rovani, M. T., Santos, J. T., Buratini, J., Price, C. A., & Gonçalves, P. B. D. (2012). FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. *Reproduction*, 143(6), 815-823. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0483>

Gattineni, J., Alphonse, P., Zhang, Q., Mathews, N., Bates, C. M., & Baum, M. (2014). Regulation of renal phosphate transport by FGF23 is mediated by FGFR1 and FGFR4. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 306(3), F351-F358. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00232.2013>

Gattineni, J., Twombly, K., Goetz, R., Mohammadi, M., & Baum, M. (2011). Regulation of serum 1,25(OH)₂Vitamin D₃ levels by fibroblast growth factor 23 is mediated by FGF receptors 3 and 4. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 301(2), F371-F377. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00740.2010>

Gelez, H., & Fabre-Nys, C. (2004). The “male effect” in sheep and goats : A review of the respective roles of the two olfactory systems. *Hormones and Behavior*, 46(3),

257-271. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.05.002>

Gilchrist, R. B. (2010). Recent insights into oocyte–follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 23-31. <https://doi.org/10.1071/RD10225>

Glister, C., Richards, S. L., & Knight, P. G. (2005). Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: Could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology*, 146(4), 1883-1892. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1303>

Gong, J. G., Lee, W. J., Garnsworthy, P. C., & Webb, R. (2002). Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction (Cambridge, England)*, 123(3), 419-427.

Gonzalez, E., & McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(16), 2502-2508.

Gospodarowicz, D., Bialecki, H., & Thakral, T. K. (1979). The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Experimental Eye Research*, 28(5), 501-514. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(79\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0014-4835(79)90038-1)

Gottsch, M. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2006). Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254-255, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.04.030>

Grado-Ahuir, J. A., Aad, P. Y., & Spicer, L. J. (2011). New insights into the pathogenesis

of cystic follicles in cattle : Microarray analysis of gene expression in granulosa cells¹. *Journal of Animal Science*, 89(6), 1769-1786. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3463>

Guerrero-Netro, H. M., Estienne, A., Chorfi, Y., & Price, C. A. (2017). The mycotoxin metabolite deepoxy- deoxynivalenol increases apoptosis and decreases steroidogenesis in bovine ovarian theca cells. *Biology of Reproduction*, 97(5), 746-757. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox127>

Gumpena, R., Lountos, G. T., Raran-Kurussi, S., Tropea, J. E., Cherry, S., & Waugh, D. S. (2018). Crystal structure of the human dual specificity phosphatase 1 catalytic domain. *Protein Science*, 27(2), 561-567. <https://doi.org/10.1002/pro.3328>

Guo, Z., & Yu, Q. (2019). Role of mTOR Signaling in Female Reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00692>

Gupta, S., M-Redmond, T., Meng, F., Tidball, A., Akil, H., Watson, S., Parent, J. M., & Uhler, M. (2018). Fibroblast growth factor 2 regulates activity and gene expression of human post-mitotic excitatory neurons. *Journal of Neurochemistry*, 145(3), 188-203. <https://doi.org/10.1111/jnc.14255>

Gutiérrez, C. G., Campbell, B. K., & Webb, R. (1997). Development of a Long-Term Bovine Granulosa Cell Culture System : Induction and Maintenance of Estradiol Production, Response to Follicle-Stimulating Hormone, and Morphological Characteristics¹. *Biology of Reproduction*, 56(3), 608-616. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.3.608>

Hammarén, H. M., Virtanen, A. T., Raivola, J., & Silvennoinen, O. (2019). The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. *Cytokine*, 118, 48-63. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.041>

- Han, S.-K. (2005). Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. *Journal of Neuroscience*, 25(49), 11349-11356. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005>
- Hansen, P. J. (2019). Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: Implications for fertility and assisted reproduction. *Animal Reproduction*, 16(3), 497-507. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0053>
- Hardy, S., Kostantin, E., Hatzihristidis, T., Zolotarov, Y., Uetani, N., & Tremblay, M. L. (2018). Physiological and oncogenic roles of the PRL phosphatases. *The FEBS Journal*, 285(21), 3886-3908. <https://doi.org/10.1111/febs.14503>
- Harter, C. J. L., Kavanagh, G. S., & Smith, J. T. (2018). The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *Journal of Endocrinology*, 238(3), R173-R183. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0108>
- He, M., Zhang, T., Yang, Y., & Wang, C. (2021). Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 596. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654028>
- Herndon, M. K., Law, N. C., Donaubaauer, E. M., Kyriss, B., & Hunzicker-Dunn, M. (2016). Forkhead box O member FOXO1 regulates the majority of follicle-stimulating hormone responsive genes in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 434, 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.020>
- Hirshfield, A. N. (1991). Theca Cells may be Present at the Outset of Follicular Growth. *Biology of Reproduction*, 44(6), 1157-1162. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.6.1157>
- Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X., & Perrimon, N. (2002). The JAK/STAT Pathway in Model Organisms: Emerging Roles in Cell Movement. *Developmental Cell*, 3(6),

765-778. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00376-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00376-3)

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D. C., Threadgill, D. W., & Conti, M. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5), 1914-1924. <https://doi.org/10.1128/MCB.01919-06>

Huang, C.-Y., & Tan, T.-H. (2012). DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & Bioscience*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-24>

Hubbard, S. R., & Till, J. H. (2000). Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 373-398. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.373>

Hui, D., Iqbal, J., Lehmann, K., Gase, K., Saluz, H. P., & Baldwin, I. T. (2003). Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray Analysis and Further Characterization of Large-Scale Changes in Herbivore-Induced mRNAs. *Plant Physiology*, 131(4), 1877-1893. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018176>

Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E., & Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 461-477. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.013>

Hunzicker-Dunn, M., & Maizels, E. T. (2006). FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression : Branching out from protein kinase A. *Cellular Signalling*, 18(9), 1351-1359. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.02.011>

Jainudeen, M. R., Wahid, H., & Hafez, E. S. E. (2016). Sheep and Goats. Dans B. Hafez & E. S. E. Hafez (Éds.), *Reproduction in Farm Animals* (p. 172-181). Lippincott Williams

& Wilkins. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch12>

Jeffrey, K. L., Camps, M., Rommel, C., & Mackay, C. R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases : Manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(5), 391-403. <https://doi.org/10.1038/nrd2289>

Jiang, Z., Guerrero-Netro, H. M., Juengel, J. L., & Price, C. A. (2013). Divergence of intracellular signaling pathways and early response genes of two closely related fibroblast growth factors, FGF8 and FGF18, in bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 375(1-2), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.017>

Jiang, Z. L., & Price, C. A. (2012). Differential actions of fibroblast growth factors on intracellular pathways and target gene expression in bovine ovarian granulosa cells. *Reproduction*, 144(5), 625-632. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0199>

Jiang, Z. L., Ripamonte, P., Buratini, J., Portela, V. M., & Price, C. A. (2011). Fibroblast growth factor-2 regulation of Sprouty and NR4A genes in bovine ovarian granulosa cells. *Journal of Cellular Physiology*, 226(7), 1820-1827. <https://doi.org/10.1002/jcp.22509>

Joyce, I. M., Clark, A. T., Pendola, F. L., & Eppig, J. J. (2000). Comparison of Recombinant Growth Differentiation Factor-9 and Oocyte Regulation of KIT Ligand Messenger Ribonucleic Acid Expression in Mouse Ovarian Follicles¹. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1669-1675. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1669>

Jurek, A., Amagasaki, K., Gembarska, A., Heldin, C.-H., & Lennartsson, J. (2009). Negative and Positive Regulation of MAPK Phosphatase 3 Controls Platelet-derived Growth Factor-induced Erk Activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4626-4634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808490200>

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., & Karin, M. (2005). Reactive

Oxygen Species Promote TNF α -Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell*, 120(5), 649-661. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.041>

Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R. J., Mandl, M., & Keyse, S. M. (2004). Both Nuclear-Cytoplasmic Shuttling of the Dual Specificity Phosphatase MKP-3 and Its Ability to Anchor MAP Kinase in the Cytoplasm Are Mediated by a Conserved Nuclear Export Signal*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41882-41891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406720200>

Karsch, F. J., Bittman, E. L., Foster, D. L., Goodman, R. L., Legan, S. J., & Robinson, J. E. (1984). Neuroendocrine Basis of Seasonal Reproduction. Dans *Proceedings of the 1983 Laurentian Hormone Conference* (p. 185-232). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571140-1.50010-4>

Karsch, F. J., Dahl, G. E., Evans, N. P., Manning, J. M., Mayfield, K. P., Moenter, S. M., & Foster, D. L. (1993). Seasonal Changes in Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion in the Ewe : Alteration in Response to the Negative Feedback Action of Estradiol. *Biology of Reproduction*, 49(6), 1377-1383. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.6.1377>

Keyse, S. M. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 27(2), 253-261. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9123-1>

Kezele, P., Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2005). Keratinocyte Growth Factor Acts as a Mesenchymal Factor That Promotes Ovarian Primordial to Primary Follicle Transition. *Biology of Reproduction*, 73(5), 967-973. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043117>

Khan, D. R., Guillemette, C., Sirard, M. A., & Richard, F. J. (2015a). Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells : A perspective on oocyte competence

- acquisition. *Molecular Human Reproduction*, 21(9), 688-701.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gav032>
- Khan, D. R., Guillemette, C., Sirard, M. A., & Richard, F. J. (2015b). Transcriptomic analysis of cyclic AMP response in bovine cumulus cells. *Physiological Genomics*, 47(9), 432-442. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00043.2015>
- Kidger, A. M., & Keyse, S. M. (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 50, 125-132.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.009>
- Knight, P. G., & Glister, C. (2006). TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132(2), 191-206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 827-837.
<https://doi.org/10.1038/nrm1743>
- Koos, R. D., & Olson, C. E. (1989). Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in the Rat Ovary: Detection of mRNA Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Amplification. *Molecular Endocrinology*, 3(12), 2041-2048.
<https://doi.org/10.1210/mend-3-12-2041>
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A. S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K. P., Klierer, S. A., & Kuro-o, M. (2007). Tissue-specific Expression of β Klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21 *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26687-26695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704165200>

- Kuwano, Y., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Martindale, J. L., Yang, X., & Gorospe, M. (2008). MKP-1 mRNA Stabilization and Translational Control by RNA-Binding Proteins HuR and NF90. *Molecular and Cellular Biology*, 28(14), 4562-4575. <https://doi.org/10.1128/MCB.00165-08>
- Lake, D., Corrêa, S. A. L., & Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4397-4413. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2297-8>
- Lanner, F., & Rossant, J. (2010). The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development*, 137(20), 3351-3360. <https://doi.org/10.1242/dev.050146>
- Lavranos, T. C., Rodgers, H. F., Bertoncello, I., & Rodgers, R. J. (1994). Anchorage-Independent Culture of Bovine Granulosa Cells : The Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Dibutyryl cAMP on Cell Division and Differentiation. *Experimental Cell Research*, 211(2), 245-251. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1084>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Leung, P. C. K., & Adashi, E. Y. (2018). *The Ovary*. <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128132098>
- Li, W. X. (2008). Canonical and non-canonical JAK–STAT signaling. *Trends in cell biology*, 18(11), 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.008>
- Lin, Y.-W., & Yang, J.-L. (2006). Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 915-926. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508720200>
- Lohi, O., & Lehto, V.-P. (2001). STAM/EAST/Hbp adapter proteins – integrators of

signalling pathways. *FEBS Letters*, 508(3), 287-290. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03079-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03079-4)

Machado, M. F., Caixeta, E. S., Sudiman, J., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Lima, P. F., Price, C. A., & Buratini, J. (2015). Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro–produced embryos in cattle. *Theriogenology*, 84(3), 390-398. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.031>

Machado, M. F., Portela, V. M., Price, C. A., Costa, I. B., Ripamonte, P., Amorim, R. L., & Buratini, J. (2009). Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *The Journal of Endocrinology*, 202(3), 347-353. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0145>

Mandl, M., Slack, D. N., & Keyse, S. M. (2005). Specific Inactivation and Nuclear Anchoring of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 by the Inducible Dual-Specificity Protein Phosphatase DUSP5. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1830-1845. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1830-1845.2005>

Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate and Cellular Signaling : Implications for Obesity and Diabetes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 35(4), 1253-1275. <https://doi.org/10.1159/000373949>

Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling : Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>

Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J.-C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J., & Pagès, G. (2005). Extracellular Signal-Regulated Kinases Phosphorylate Mitogen-

Activated Protein Kinase Phosphatase 3/DUSP6 at Serines 159 and 197, Two Sites Critical for Its Proteasomal Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), 854-864. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.2.854-864.2005>

Marengere, L. E. M., Songyang, Z., Gish, G. D., Schaller, M. D., Parsons, J. T., Stern, M. J., Cantley, L. C., & Pawson, T. (1994). SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature*, 369(6480), 502-505. <https://doi.org/10.1038/369502a0>

Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling : Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179-185. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8)

Martin, G. B., & Scaramuzzi, R. J. (1983). The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. *Journal of Steroid Biochemistry*, 19(1C), 869-875. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(83\)90026-2](https://doi.org/10.1016/0022-4731(83)90026-2)

Mason, J. M., Morrison, D. J., Basson, M. A., & Licht, J. D. (2006). Sprouty proteins : Multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends in Cell Biology*, 16(1), 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.11.004>

Matos, M. H. T., Lima-Verde, I. B., Bruno, J. B., Lopes, C. A. P., Martins, F. S., Santos, K. D. B., Rocha, R. M. P., Silva, J. R. V., Bão, S. N., & Figueiredo, J. R. (2007). Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(5), 677. <https://doi.org/10.1071/RD07021>

Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. (2012). Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries : Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 44-50. <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>

- Matsuo, I., & Kimura-Yoshida, C. (2013). Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(4), 399-407. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.02.004>
- McNatty, K. P., Smith, P., Hudson, N. L., Heath, D. A., Tisdall, D. J., O, W. S., & Braw-Tal, R. (1995). Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 49, 123-135.
- Minozzi, G., Nicolazzi, E. L., Stella, A., Biffani, S., Negrini, R., Lazzari, B., Ajmone-Marsan, P., & Williams, J. L. . (2013). Genome Wide Analysis of Fertility and Production Traits in Italian Holstein Cattle. *PLoS ONE*, 8(11), e80219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080219>
- Miraoui, H., Dwyer, A. A., Sykiotis, G. P., Plummer, L., Chung, W., Feng, B., Beenken, A., Clarke, J., Pers, T. H., Dworzynski, P., Keefe, K., Niedziela, M., Raivio, T., Crowley, W. F., Seminara, S. B., Quinton, R., Hughes, V. A., Kumanov, P., Young, J., ... Pitteloud, N. (2013). Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 Are Identified in Individuals with Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *The American Journal of Human Genetics*, 92(5), 725-743. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.008>
- Mishra, S. R., Parmar, M. S., Chouhan, V. S., Rajesh, G., Yadav, V. P., Bharti, M. K., Bharati, J., Mondal, T., Reshma, R., Paul, A., Dangi, S. S., Das, B. C., González, L. A., Sharma, G. T., Singh, G., & Sarkar, M. (2016). Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family in corpus luteum during different stages of estrous cycle and synergistic role of FGF2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) on

steroidogenesis, angiogenesis and survivability of cultured buffalo luteal cells. *Agri Gene*, 1, 53-68. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2016.07.001>

Miyoshi, T., Otsuka, F., Yamashita, M., Inagaki, K., Nakamura, E., Tsukamoto, N., Takeda, M., Suzuki, J., & Makino, H. (2010). Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 325(1-2), 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.012>

Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbiès-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., & Uzbekova, S. (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *Inra Prod.Anim*, 22(6), 59-76.

Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., & Monget, P. (2014a). The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles : What Is the Link? *Biology of Reproduction*, 90(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117077>

Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., & Monget, P. (2014b). The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles : What Is the Link? *Biology of Reproduction*, 90(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117077>

Monteiro, H. P., Albuquerque, M. T. O. M., Rocha Oliveira, C. J., & Curcio, M. F. (2018). Chapter 3 - Signal Transduction Pathways in Endothelial Cells : Implications for Angiogenesis. Dans P. L. Da Luz, P. Libby, A. C. P. Chagas, & F. R. M. Laurindo (Éds.), *Endothelium and Cardiovascular Diseases* (p. 23-36). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812348-5.00003-9>

- Moore, K., & Thatcher, W. W. (2006). Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1254-1266. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72194-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72194-4)
- Moore, R. K., Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2004). Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(8), 356-361. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.08.008>
- Moosavi, S. M., Prabhala, P., & Ammit, A. J. (2017). Role and regulation of MKP-1 in airway inflammation. *Respiratory Research*, 18(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0637-3>
- Morohaku, K. (2019). A way for in vitro/ex vivo egg production in mammals. *The Journal of Reproduction and Development*, 65(4), 281. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-024>
- Mottershead, D. G., Sugimura, S., Al-Musawi, S. L., Li, J.-J., Richani, D., White, M. A., Martin, G. A., Trotta, A. P., Ritter, L. J., Shi, J., Mueller, T. D., Harrison, C. A., & Gilchrist, R. B. (2015). Cumulin, an Oocyte-secreted Heterodimer of the Transforming Growth Factor- β Family, Is a Potent Activator of Granulosa Cells and Improves Oocyte Quality. *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), 24007-24020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671487>
- Nilsson, E. E., Kezele, P., & Skinner, M. K. (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188(1), 65-73. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00746-8)
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258(5082), 607-614.

<https://doi.org/10.1126/science.1411571>

Niu, G.-J., Xu, J.-D., Yuan, W.-J., Sun, J.-J., Yang, M.-C., He, Z.-H., Zhao, X.-F., & Wang, J.-X. (2018). Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) Negatively Regulates the JAK/STAT Pathway by Inhibiting STAT Phosphorylation and Translocation. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02392>

Niu, W., Wang, Y., Wang, Z., Xin, Q., Wang, Y., Feng, L., Zhao, L., Wen, J., Zhang, H., Wang, C., & Xia, G. (2016). JNK signaling regulates E-cadherin junctions in germline cysts and determines primordial follicle formation in mice. *Development (Cambridge, England)*, *143*(10), 1778-1787. <https://doi.org/10.1242/dev.132175>

Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., & Uemura, T. (2002). Control of Actin Reorganization by Slingshot, a Family of Phosphatases that Dephosphorylate ADF/Cofilin. *Cell*, *108*(2), 233-246. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00638-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00638-9)

Noseir, W. M. (2003). Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: The development of 2 versus 3 waves. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, *1*, 50. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-50>

Nunes-Xavier, C., Romá-Mateo, C., Ríos, P., Tárrega, C., Cejudo-Marín, R., Tabernero, L., & Pulido, R. (2011). Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *11*(1), 109-132. <https://doi.org/10.2174/187152011794941190>

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, *2*(3),

reviews3005.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005>

Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), 215-266. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>

Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G., & Goldfarb, M. (1996). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family *. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15292-15297. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15292>

Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D., & Lonai, P. (1993). Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Developmental Biology*, 158(2), 475-486. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1205>

Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2002). A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand : Its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8060-8065. <https://doi.org/10.1073/pnas.122066899>

Oulion, S., Bertrand, S., & Escriva, H. (2012). Evolution of the FGF Gene Family. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, 298147. <https://doi.org/10.1155/2012/298147>

Padmanabhan, V., & Cardoso, R. C. (2020). Neuroendocrine, autocrine, and paracrine control of follicle-stimulating hormone secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 500, 110632. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110632>

Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., & Conti, M. (2008). Luteinizing Hormone

- Signaling in Preovulatory Follicles Involves Early Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway. *Molecular Endocrinology*, 22(4), 924-936. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0246>
- Parrott, J. A., & Skinner, M. K. (1998). Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle. *Endocrinology*, 139(1), 228-235. <https://doi.org/10.1210/endo.139.1.5680>
- Parrott, J. A., Vigne, J. L., Chu, B. Z., & Skinner, M. K. (1994). Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology*, 135(2), 569-575. <https://doi.org/10.1210/endo.135.2.8033804>
- Patterson, K. I., Brummer, T., O'Brien, P. M., & Daly, R. J. (2009). Dual-specificity phosphatases : Critical regulators with diverse cellular targets. *Biochemical Journal*, 418(3), 475-489. <https://doi.org/10.1042/BJ20082234>
- Pavic, K., Duan, G., & Köhn, M. (2015). VHR/DUSP3 phosphatase : Structure, function and regulation. *The FEBS Journal*, 282(10), 1871-1890. <https://doi.org/10.1111/febs.13263>
- Peluso, J. J., Pappalardo, A., & Fernandez, G. (2001). Basic Fibroblast Growth Factor Maintains Calcium Homeostasis and Granulosa Cell Viability by Stimulating Calcium Efflux via a PKC δ -Dependent Pathway. *Endocrinology*, 142(10), 4203-4211. <https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8460>
- Pepling, M. (2013). Oocyte Development before and during Folliculogenesis. Dans *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals* (p. 1-19). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118538074.ch1>

- Pérez-Sen, R., Queipo, M. J., Gil-Redondo, J. C., Ortega, F., Gómez-Villafuertes, R., Miras-Portugal, M. T., & Delicado, E. G. (2019). Dual-Specificity Phosphatase Regulation in Neurons and Glial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081999>
- Phan, T. K., Williams, S. A., Bindra, G. K., Lay, F. T., Poon, I. K. H., & Hulett, M. D. (2019). Phosphoinositides : Multipurpose cellular lipids with emerging roles in cell death. *Cell Death & Differentiation*, *26*(5), 781-793. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0269-2>
- Portela, V. M., Dirandeh, E., Guerrero-Netro, H. M., Zamberlam, G., Barreta, M. H., Goetten, A. F., & Price, C. A. (2015). The Role of Fibroblast Growth Factor-18 in Follicular Atresia in Cattle. *Biology of Reproduction*, *92*(1), 14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121376>
- Portela, V. M., Zamberlam, G., Gonçalves, P. B. D., de Oliveira, J. F. C., & Price, C. A. (2011). Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. *Biology of Reproduction*, *85*(6), 1167-1174. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094193>
- Portela, V., Machado, M., Buratini, J., Zamberlam, G., Amorim, R. L., Goncalves, P., & Price, C. A. (2010). Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, *83*(3), 339-346. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084277>
- Potthoff, M. J., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2012). Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21 : From feast to famine. *Genes & Development*, *26*(4), 312-324. <https://doi.org/10.1101/gad.184788.111>

- Powers, C. J., McLeskey, S. W., & Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 7(3), 165-197. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0070165>
- Price, C. A. (2016). Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *The Journal of Endocrinology*, 228(2), R31-43. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0414>
- Prudovsky, I., Bagala, C., Tarantini, F., Mandinova, A., Soldi, R., Bellum, S., & Maciag, T. (2002). The intracellular translocation of the components of the fibroblast growth factor 1 release complex precedes their assembly prior to export. *Journal of Cell Biology*, 158(2), 201-208. Scopus. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203084>
- Puscheck, E. E., Patel, Y., & Rappolee, D. A. (1997). Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-4, but not FGFR-3 is expressed in the pregnant ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 132(1-2), 169-176. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(97\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(97)00131-7)
- Rane, S. G., & Reddy, E. P. (2000). Janus kinases : Components of multiple signaling pathways. *Oncogene*, 19(49), 5662-5679. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203925>
- Ravindra, J. P., Rawlings, N. C., Evans, A. C., & Adams, G. P. (1994). Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(2), 501-509. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010501>
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., & Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117(8), 1281-1283. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963>
- Reddy, P., Adhikari, D., Zheng, W., Liang, S., Hämäläinen, T., Tohonen, V., Ogawa, W., Noda, T., Volarevic, S., Huhtaniemi, I., & Liu, K. (2009). PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial

follicles. *Human Molecular Genetics*, 18(15), 2813-2824.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp217>

Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hämäläinen, T., Peng, S. L., Lan, Z.-J., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I., & Liu, K. (2008). Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. *Science*, 319(5863), 611-613. <https://doi.org/10.1126/science.1152257>

Regad, T. (2015). Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers*, 7(3), 1758-1784. <https://doi.org/10.3390/cancers7030860>

Richani, D., & Gilchrist, R. B. (2018). The epidermal growth factor network : Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update*, 24(1), 1-14. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029>

Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., & Espey, L. L. (2002). Ovulation : New Dimensions and New Regulators of the Inflammatory-Like Response. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 69-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.131029>

Rios, P., Li, X., & Köhn, M. (2013). Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *The FEBS Journal*, 280(2), 505-524. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08565.x>

Rodriguez, A., Rydze, R. T., Briley, S. M., & Pangas, S. A. (2019). Transgenic Mouse Models in the Study of Ovarian Function. Dans *The Ovary* (p. 295-310). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00018-2>

Ronayne, E., Jordan, B., Quirke, J. F., & Roche, J. F. (1989). The effect of frequency of administration of melatonin on the time of onset of the breeding season in anoestrous ewes. *Animal Reproduction Science*, 18(1), 13-24. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90003-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90003-1)

- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases : Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105-143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Roth, Z. (2017). Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows : Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5(1), 151-170. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022849>
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R., & Wolfenson, D. (2000). Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Reproduction*, 120(1), 83-90. <https://doi.org/10.1530/reprod/120.1.83>
- Saint-Dizier, M., & Chastant-Maillard, S. (2014). *La reproduction animale et humaine*. Éditions Quae.
- Salzman, A., Wan, C. F., & Rubin, C. S. (1984). Biogenesis, transit, and functional properties of the insulin proreceptor and modified insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Use of monensin to probe proreceptor cleavage and generate altered receptor subunits. *Biochemistry*, 23(26), 6555-6565. <https://doi.org/10.1021/bi00321a043>
- Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1896-1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
- Sanfins, A., Rodrigues, P., & Albertini, D. F. (2018). GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(10), 1741-1750. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1268-4>
- Santos-Biase, W. K. F., Biase, F. H., Buratini, J., Balieiro, J., Watanabe, Y. F., Accorsi, M. F., Ferreira, C. R., Stranieri, P., Caetano, A. R., & Meirelles, F. V. (2012). Single

nucleotide polymorphisms in the bovine genome are associated with the number of oocytes collected during ovum pick up. *Animal Reproduction Science*, 134(3), 141-149.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.017>

Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Campbell, B. K., Driancourt, M.-A., Dupont, J., Fortune, J. E., Gilchrist, R. B., Martin, G. B., McNatty, K. P., McNeilly, A. S., Monget, P., Monniaux, D., Viñoles, C., & Webb, R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility, and Development*, 23(3), 444-467. <https://doi.org/10.1071/RD09161>

Schäfer, T., Zentgraf, H., Zehe, C., Brügger, B., Bernhagen, J., & Nickel, W. (2004). Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2 Is Mediated by Direct Translocation across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6244-6251. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310500200>

Schams, D., Steinberg, V., Steffl, M., Meyer, H. H. D., & Berisha, B. (2009). Expression and possible role of fibroblast growth factor family members in porcine antral follicles during final maturation. *Reproduction*, 138(1), 141-149. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0033>

Schatten, H., & Constantinescu, G. M. (Éds.). (2017). *Animal models and human reproduction*. Wiley/Blackwell.

Schlessinger, J., & Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, 9(3), 383-391. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90177-F](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90177-F)

Schuermann, Y., Siddappa, D., Pansera, M., & Duggavathi, R. (2018). Activated receptor tyrosine kinases in granulosa cells of ovulating follicles in mice. *Molecular Reproduction and Development*, 85(4), 316-324. <https://doi.org/10.1002/mrd.22966>

- Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., & Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling : CCS*, *15*. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0177-y>
- Shikone, T., Yamoto, M., & Nakano, R. (1992). Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. *Endocrinology*, *131*(3), 1063-1068. <https://doi.org/10.1210/en.131.3.1063>
- Shimizu, T., Jiang, J.-Y., Sasada, H., & Sato, E. (2002). Changes of Messenger RNA Expression of Angiogenic Factors and Related Receptors During Follicular Development in Gilts¹. *Biology of Reproduction*, *67*(6), 1846-1852. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.006734>
- Shirasuna, K., Asaoka, H., Acosta, T. J., Wijayagunawardane, M. P. B., Ohtani, M., Hayashi, K.-G., Matsui, M., & Miyamoto, A. (2004). Real-time dynamics of prostaglandin F₂ α release from uterus and corpus luteum during spontaneous luteolysis in the cow. *Reproduction*, *128*(2), 189-195. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00183>
- Silva, M. J., & Price, C. A. (2000). Effect of Follicle-Stimulating Hormone on Steroid Secretion and Messenger Ribonucleic Acids Encoding Cytochromes P450 Aromatase and Cholesterol Side-Chain Cleavage in Bovine Granulosa Cells In Vitro. *Biology of Reproduction*, *62*(1), 186-191. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.186>
- Smith, P., O. W. S., Hudson, N. L., Shaw, L., Heath, D. A., Condell, L., Phillips, D. J., & McNatty, K. P. (1993). Effects of the Booroola gene (FecB) on body weight, ovarian development and hormone concentrations during fetal life. *Journal of Reproduction and Fertility*, *98*(1), 41-54. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980041>

- Sobinoff, A. P., Sutherland, J. M., & McLaughlin, E. A. (2013). Intracellular signalling during female gametogenesis. *Molecular Human Reproduction*, *19*(5), 265-278. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas065>
- Somm, E., & Jornayvaz, F. R. (2018). Fibroblast Growth Factor 15/19 : From Basic Functions to Therapeutic Perspectives. *Endocrine Reviews*, *39*(6), 960-989. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00134>
- Sorkin, A., & Goh, L. K. (2008). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental cell research*, *314*(17), 3093-3106. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.07.029>
- Steinmetz, R., Wagoner, H. A., Zeng, P., Hammond, J. R., Hannon, T. S., Meyers, J. L., & Pescovitz, O. H. (2004). Mechanisms Regulating the Constitutive Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway in Ovarian Cancer and the Effect of Ribonucleic Acid Interference for ERK1/2 on Cancer Cell Proliferation. *Molecular Endocrinology*, *18*(10), 2570-2582. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0082>
- Steringer, J. P., Müller, H.-M., & Nickel, W. (2015). Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2—A Novel Type of Protein Translocation across Membranes? *Journal of Molecular Biology*, *427*(6, Part A), 1202-1210. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.012>
- Stirling, D., Waterman, M. R., & Simpson, E. R. (1991). Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, *91*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910001>
- Sugiura, R., Satoh, R., Ishiwata, S., Umeda, N., & Kita, A. (2011). Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway. *Journal of Signal Transduction*, *2011*.

<https://doi.org/10.1155/2011/109746>

Sullivan, R. R., Faris, B. R., Eborn, D., Grieger, D. M., Cino-Ozuna, A. G., & Rozell, T. G. (2013). Follicular expression of follicle stimulating hormone receptor variants in the ewe. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *11*, 113.

<https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-113>

Sun, T., & Diaz, F. J. (2019). Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *17*(1), 113.

<https://doi.org/10.1186/s12958-019-0552-1>

Sutherland, J. M., Keightley, R. A., Nixon, B., Roman, S. D., Robker, R. L., Russell, D. L., & McLaughlin, E. A. (2012). Suppressor of cytokine signaling 4 (SOCS4) : Moderator of ovarian primordial follicle activation. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(3), 1188-1198. <https://doi.org/10.1002/jcp.22837>

Suzuki, M., Uehara, Y., Motomura-Matsuzaka, K., Oki, J., Koyama, Y., Kimura, M., Asada, M., Komi-Kuramochi, A., Oka, S., & Imamura, T. (2008). BetaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *22*(4), 1006-1014.

<https://doi.org/10.1210/me.2007-0313>

Sweet, L. J., Morrison, B. D., & Pessin, J. E. (1987). Isolation of functional alpha beta heterodimers from the purified human placental alpha 2 beta 2 heterotetrameric insulin receptor complex. A structural basis for insulin binding heterogeneity. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(15), 6939-6942.

Thomas, F. H., Ismail, R. S., Jiang, J.-Y., & Vanderhyden, B. C. (2008). Kit Ligand 2 Promotes Murine Oocyte Growth In Vitro1. *Biology of Reproduction*, *78*(1), 167-175.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058529>

Thompson, J. G., Mottershead, D. G., & Gilchrist, R. B. (2013). Oocyte-Secreted Factors in Domestic Animals. Dans *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals* (p. 55-70). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118538074.ch4>

Tisdall, D. J., Watanabe, K., Hudson, N. L., Smith, P., & McNatty, K. P. (1995). FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *Journal of Molecular Endocrinology*, *15*(3), 273-281. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0150273>

Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C. J., Cohen, P., & Ullrich, A. (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Current Biology*, *4*(8), 694-701. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00154-8)

Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling : From development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, *10*(2), 116-129. <https://doi.org/10.1038/nrc2780>

Ueda, K., Arakawa, H., & Nakamura, Y. (2003). Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene*, *22*(36), 5586-5591. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206845>

Uma, J., Muraly, P., Verma-Kumar, S., & Medhamurthy, R. (2003). Determination of onset of apoptosis in granulosa cells of the preovulatory follicles in the bonnet monkey (*Macaca radiata*) : Correlation with mitogen-activated protein kinase activities. *Biology of Reproduction*, *69*(4), 1379-1387. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017897>

Valve, E., Penttilä, T.-L., Paranko, J., & Härkönen, P. (1997). FGF-8 Is Expressed during Specific Phases of Rodent Oocyte and Spermatogonium Development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *232*(1), 173-177. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6256>

- Varelas, X. (2014). The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*, *141*(8), 1614-1626. <https://doi.org/10.1242/dev.102376>
- Wagner, M. J., Stacey, M. M., Liu, B. A., & Pawson, T. (2013). Molecular Mechanisms of SH2- and PTB-Domain-Containing Proteins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008987>
- Wandji, S.-A., Pelletier, G., & Sirard, M.-A. (1992). Ontogeny and Cellular Localization of 125I-Labeled Insulin-Like Growth Factor-I, 125I-Labeled Follicle-Stimulating Hormone, and 125I-Labeled Human Chorionic Gonadotropin Binding Sites in Ovaries from Bovine Fetuses and Neonatal Calves¹. *Biology of Reproduction*, *47*(5), 814-822. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.5.814>
- Wandji, S.-A., Sršeň, V., Voss, A. K., Eppig, J. J., & Fortune, J. E. (1996). Initiation in Vitro of Growth of Bovine Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, *55*(5), 942-948. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.942>
- Wang, H., Lu, Y., Huang, W., Papoutsakis, E. T., Fuhrken, P., & Eklund, E. A. (2007). HoxA10 activates transcription of the gene encoding mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 (Mkp2) in myeloid cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(22), 16164-16176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610556200>
- Wang, Y., Kong, N., Li, N., Hao, X., Wei, K., Xiang, X., Xia, G., & Zhang, M. (2013). Epidermal growth factor receptor signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and meiotic resumption in mouse oocytes. *Endocrinology*, *154*(9), 3401-3409. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1133>

- Wang, Z., Liu, C.-Y., Zhao, Y., & Dean, J. (2020). FIGLA, LHX8 and SOHLH1 transcription factor networks regulate mouse oocyte growth and differentiation. *Nucleic Acids Research*, 48(7), 3525-3541. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa101>
- Wear, H. M., McPike, M. J., & Watanabe, K. H. (2016). From primordial germ cells to primordial follicles : A review and visual representation of early ovarian development in mice. *Journal of Ovarian Research*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0246-7>
- Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J.-G., & Armstrong, D. G. (2004). Control of follicular growth : Local interactions and nutritional influences,. *Journal of Animal Science*, 82(suppl_13), E63-E74. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE63x
- Wei, M., Korotkov, K. V., & Blackburn, J. S. (2018). Targeting phosphatases of regenerating liver (PRLs) in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 190, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.014>
- Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2000). Morphology and Physiology of the Ovary. Dans K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (Éds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
- Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2012). *Morphology and Physiology of the Ovary*. /books/NBK278951/
- Wiltbank, M. C., Shiao, T. F., Bergfelt, D. R., & Ginther, O. J. (1995). Prostaglandin F2 α Receptors in the Early Bovine Corpus Luteum1. *Biology of Reproduction*, 52(1), 74-78. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.1.74>

- Wise, M. E., Armstrong, D. V., Huber, J. T., Hunter, R., & Wiersma, F. (1988). Hormonal Alterations in the Lactating Dairy Cow in Response to Thermal Stress. *Journal of Dairy Science*, *71*(9), 2480-2485. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79834-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79834-3)
- Woods, D. C., & Johnson, A. L. (2006a). Phosphatase Activation by Epidermal Growth Factor Family Ligands Regulates Extracellular Regulated Kinase Signaling in Undifferentiated Hen Granulosa Cells. *Endocrinology*, *147*(10), 4931-4940. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0194>
- Woods, D. C., & Johnson, A. L. (2006b). Phosphatase Activation by Epidermal Growth Factor Family Ligands Regulates Extracellular Regulated Kinase Signaling in Undifferentiated Hen Granulosa Cells. *Endocrinology*, *147*(10), 4931-4940. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0194>
- Wu, D., Peng, F., Zhang, B., Ingram, A. J., Kelly, D. J., Gilbert, R. E., Gao, B., Kumar, S., & Krepinsky, J. C. (2009). EGFR-PLC γ 1 signaling mediates high glucose-induced PKC β 1-Akt activation and collagen I upregulation in mesangial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *297*(3), F822-F834. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00054.2009>
- Wu, G. S. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, *26*(3-4), 579-585. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9079-6>
- Wu, X., Ge, H., Lemon, B., Vonderfecht, S., Weiszmann, J., Hecht, R., Gupte, J., Hager, T., Wang, Z., Lindberg, R., & Li, Y. (2010). FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(8), 5165-5170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068783>

- Xu, S., Furukawa, T., Kanai, N., Sunamura, M., & Horii, A. (2005). Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Journal of Human Genetics*, *50*(4), 159-167. <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0235-y>
- Yang, M. Y., & Fortune, J. E. (2008). The Capacity of Primordial Follicles in Fetal Bovine Ovaries to Initiate Growth In Vitro Develops During Mid-Gestation and Is Associated with Meiotic Arrest of Oocytes. *Biology of Reproduction*, *78*(6), 1153-1161. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066688>
- Yeates, N. T. M. (1949). The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *The Journal of Agricultural Science*, *39*(1), 1-43. <https://doi.org/10.1017/S0021859600004299>
- Yeh, B. K., Igarashi, M., Eliseenkova, A. V., Plotnikov, A. N., Sher, I., Ron, D., Aaronson, S. A., & Mohammadi, M. (2003). Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2266-2271. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436500100>
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., & Nishikawa, S.-I. (1997). Stepwise Requirement of c-kit Tyrosine Kinase in Mouse Ovarian Follicle Development. *Developmental Biology*, *184*(1), 122-137. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8503>
- Yu, F.-X., & Guan, K.-L. (2013). The Hippo pathway : Regulators and regulations. *Genes & Development*, *27*(4), 355-371. <https://doi.org/10.1101/gad.210773.112>
- Zamberlam, G., Sahmi, F., & Price, C. A. (2014). Nitric oxide synthase activity is critical for the preovulatory epidermal growth factor-like cascade induced by luteinizing hormone in bovine granulosa cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *74*, 237-244.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.018>

Zhang, K., & Ealy, A. D. (2012). Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development. *Domestic Animal Endocrinology*, 42(4), 230-238.

<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.12.006>

Zhang, K., Hansen, P. J., & Ealy, A. D. (2010). Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(6), 815-826. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0190>

Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., & Ornitz, D. M. (2006). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15694-15700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601252200>

Zhao, Y., & Zhang, Z.-Y. (2001). The Mechanism of Dephosphorylation of Extracellular Signal-regulated Kinase 2 by Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase 3*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 32382-32391.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M103369200>

Zinatizadeh, M. R., Miri, S. R., Zarandi, P. K., Chalbatani, G. M., Rapôso, C., Mirzaei, H. R., Akbari, M. E., & Mahmoodzadeh, H. (2019). The Hippo Tumor Suppressor Pathway (YAP/TAZ/TEAD/MST/LATS) and EGFR-RAS-RAF-MEK in cancer metastasis. *Genes & Diseases*, 8(1), 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.11.003>

Annexes

ANNEXE 1 – Auteurs de l'article 3 en préparation

Dual specificity phosphatases 1 and 6 mRNA are maintained at basal levels by Hippo signaling pathway in bovine pre-ovulatory granulosa cells

Lauriane Relav^{1†}, Esdras Corrêa dos Santos^{1†}, Gustavo Zamberlam¹ and Christopher A. Price¹

[†] These authors contributed equally to this work

¹ Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, J2S 7C6 QC Canada.

Correspondence should be addressed to CA Price: christopher.price@umontreal.ca

or to G Zamberlam: gustavo.zamberlam@umontreal.ca

ANNEXE 2 – Abondance des ARNm codant pour *DUSP1*, *DUSP6* et *EREG* après stimulation par la LH

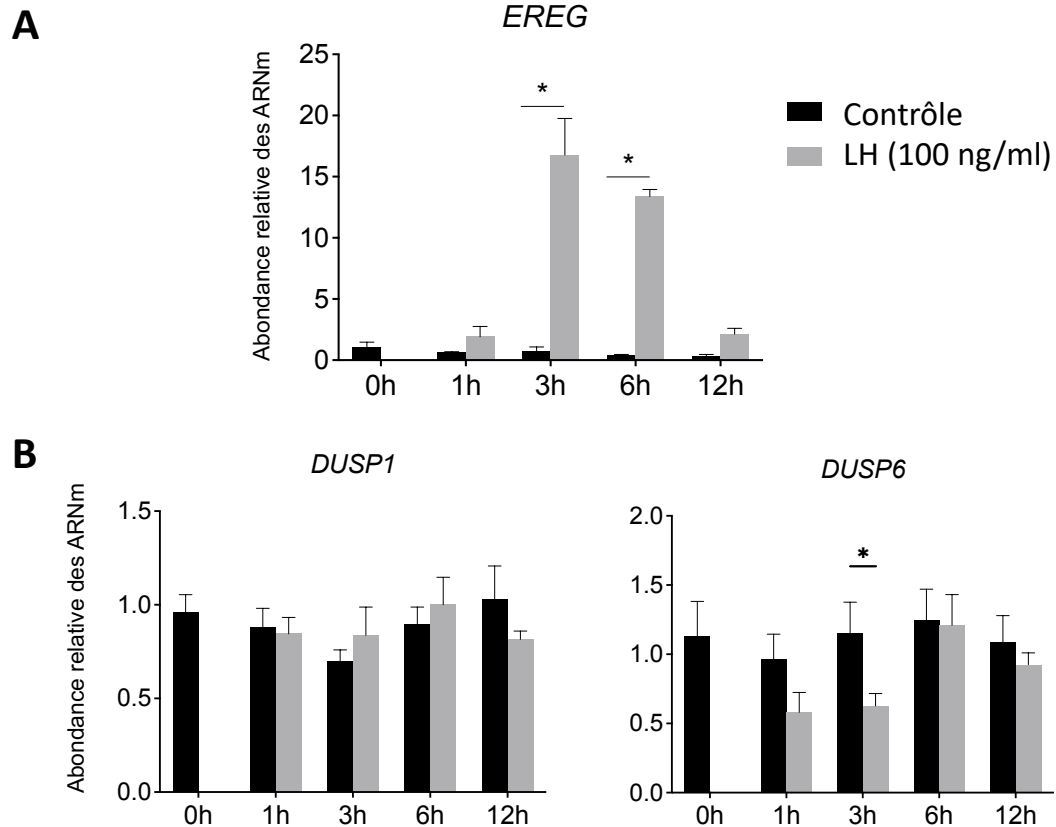


Figure 1. – Abondance des ARNm codant pour *DUSP1*, *DUSP6* et *EREG* après stimulation à la LH. Les abondances des transcrits pour (A) *EREG* et (B) *DUSP1*, *DUSP6* ont été mesurées relativement à *RPL19*, *SDHA*, *YWHAZ* par RT-qPCR dans des cellules de granulosa bovines mises en culture, préalablement isolées de follicules de plus de 10 mm (modèle pré-ovulatoire). Avant d’être stimulées à la LH (100ng/mL) pour différentes durées, les cellules ont été privées du sérum habituellement présent dans le milieu de culture. Cette concentration de LH correspond à la concentration suffisante pour augmenter l’expression de *EREG*, un gène cible connu. Les différences significatives sont signalées par des astérisques (Fisher’s LSD, $p < 0.05$).

ANNEXE 3 – Diminution des transcrits pour *DUSP6* en présence de vertéporfine, un inhibiteur ciblant des effecteurs de la voie Hippo, et de LH

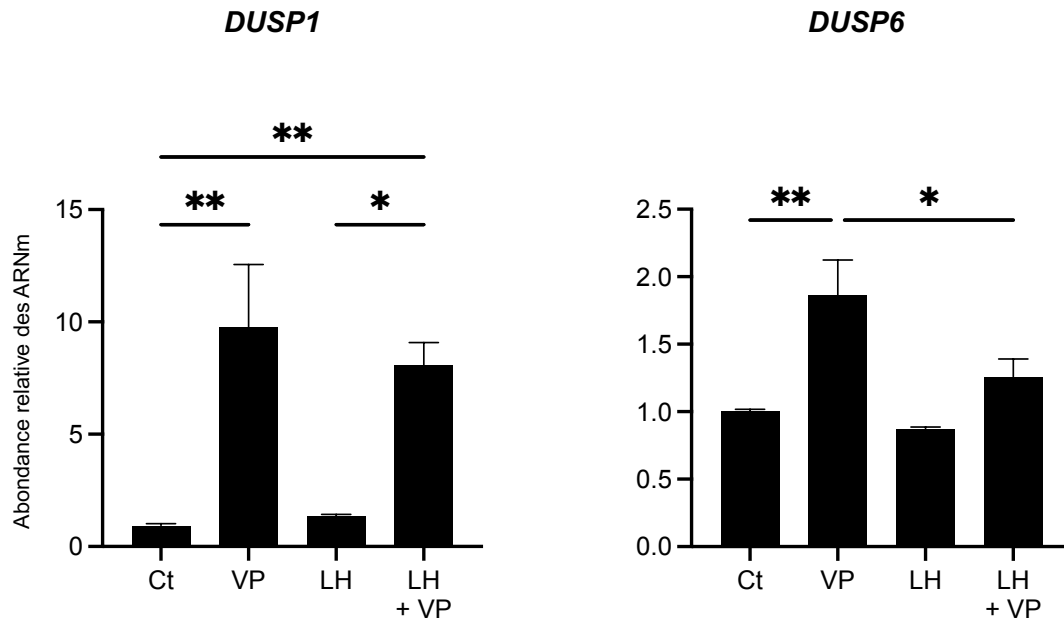


Figure 1. – Diminution des transcrits pour *DUSP6* en présence de vertéporfine, un inhibiteur ciblant des effecteurs de la voie Hippo, et de LH. Des cultures de cellules de granulosa provenant de follicules de plus de 10 mm ont été pré-traitées avec la vertéporfine (VP, 1 μ M) pendant 1h. Il s’agit d’un inhibiteur de la liaison YAP/TEAD, impliqués dans la voie Hippo. Ensuite, la LH (100ng/mL) a été ajoutée au milieu de culture pendant 6h. Au préalable, les cellules ont été privées du sérum habituellement présent dans le milieu de culture. Les niveaux d’ARNm ont été mesurés dans ces échantillons relativement à *RPL19*, *SDHA*, *YWHAZ* par RT-qPCR. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (Fisher’s LSD, $p < 0.05$).

ANNEXE 4 – Régulation des transcrits pour *DUSP1* et *DUSP6* par des inhibiteurs ciblant des effecteurs de la voie Hippo et par EGF

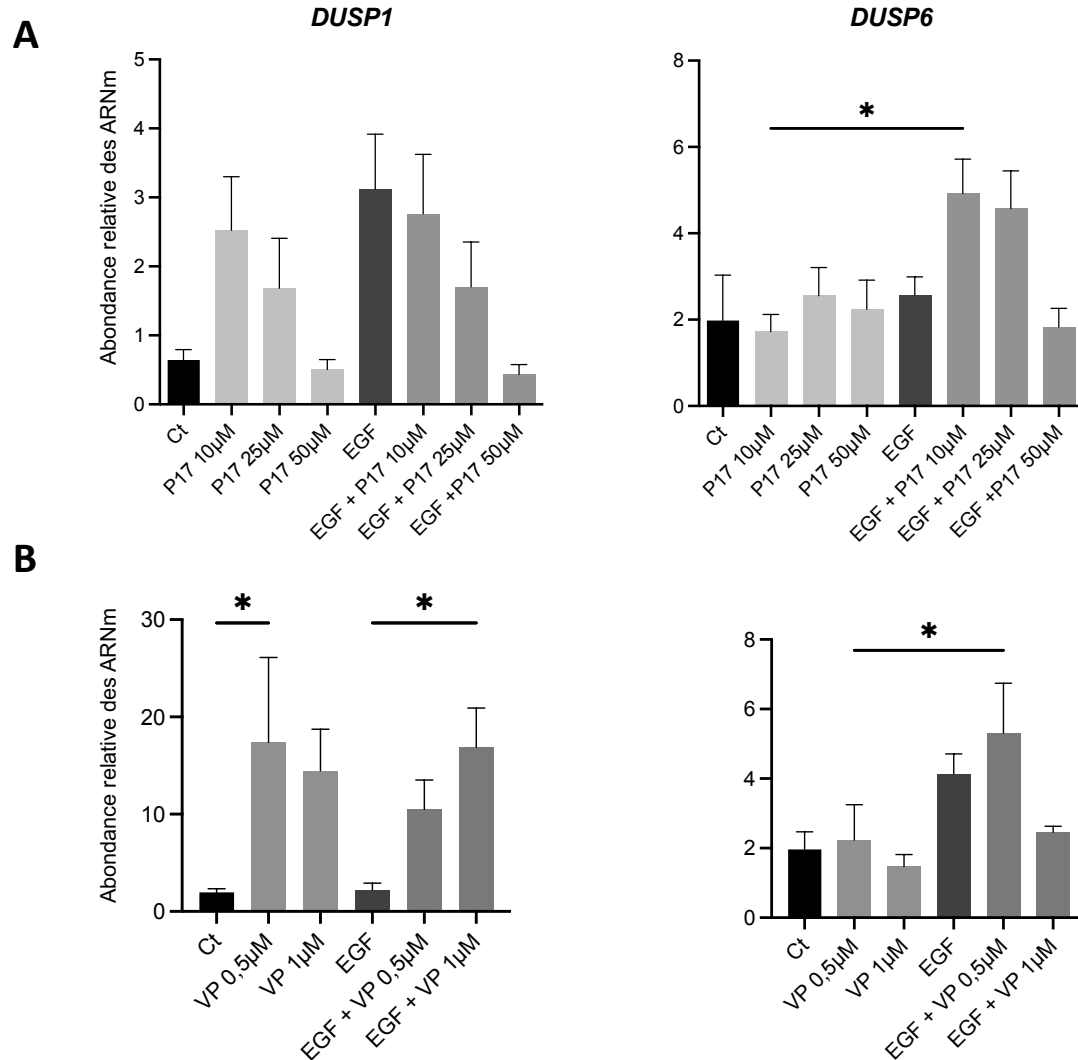


Figure 3. – Régulation des transcrits pour *DUSP1* et *DUSP6* par des inhibiteurs ciblant des effecteurs de la voie Hippo et par EGF. Des cultures de cellules de granulosa bovines provenant de follicules pré-ovulatoires (plus de 10 mm) ont été privées de sérum, puis pré-traitées avec le peptide-17 (P17, 10-25-50 μ M) ou (B) la vertéporfine (VP, 0,5-1 μ M) pendant 1h. Ce sont deux inhibiteurs de la voie Hippo, empêchant la liaison YAP/TEAD. Ensuite, de l'EGF (10 ng/mL) a été ajouté dans le milieu de pendant 6 h supplémentaires. Des astérisques indiquent les différences significatives (Fisher's LSD, $p < 0,05$).